

AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR UNFALLCHIRURGIE  
PROF. DR. DR. V. ALT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Oberflächenrauheit und Knorpelzellaktivität nach Behandlung des Gelenkknorpels  
mit bipolarer Radiofrequenzenergie

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Daniela Schlosser*

2020



AUS DEM LEHRSTUHL  
FÜR UNFALLCHIRURGIE  
PROF. DR. DR. V. ALT  
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Oberflächenrauheit und Knorpelzellaktivität nach Behandlung des Gelenkknorpels  
mit bipolarer Radiofrequenzenergie

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
*Daniela Schlosser*

2020

Dekan:	Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter:	<i>PD Dr. Michaela Huber</i>
2. Berichterstatter:	<i>PD Dr. Markus Zimmermann</i>
Tag der mündlichen Prüfung:	14.12.2020

*Meiner Familie*

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
AM	Acetoxymethylester
B1	Einmalige kontinuierliche bipolare RFE-Behandlung
B2	Zweimalige kontinuierliche bipolare RFE-Behandlung
B1p1	Einmalige gepulste bipolare RFE-Behandlung mit einem Behandlungsintervall von einer Sekunde
B2p1	Zweimalige gepulste bipolare RFE-Behandlung mit einem Behandlungsintervall von einer Sekunde
B1p2	Einmalige gepulste bipolare RFE-Behandlung mit einem Behandlungsintervall von zwei Sekunden
B2p2	Zweimalige gepulste bipolare RFE-Behandlung mit einem Behandlungsintervall von zwei Sekunden
CLSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
cm	Zentimeter
DEVD	Aminosäuresequenz: Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin- Asparaginsäure
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , ein weit verbreitetes Basismedium für die Unterstützung des Wachstums verschiedener Säugetierzellen
et al.	Et altera
Fa.	Firma
GAGs	Glukosaminoglykane
GHz	Gigahertz
GUK	Geschliffener unbehandelter Knorpel
°C	Grad Celsius
h	Stunde(n)
Hz	Hertz
H <sub>2</sub> O	Wasser
ICRS	<i>International Cartilage Research Society</i>
kHz	Kilohertz

KOOS	<i>Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Scores</i>
M	Molar
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
Max	Maximum
min	Minute
Min	Minimum
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
N	Grundgesamtheit
n	Stichprobengröße
NaCl	Natrium-Chlorid
NK	Nativer Knorpel
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OA	Osteoarthrose
OTH	Ostbayerische Technische Hochschule
p1	Gepulst mit einem Behandlungsintervall von einer Sekunde
p2	Gepulst mit einem Behandlungsintervall von zwei Sekunden
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
%	Prozent
RCBE	<i>Regensburg Center of Biomedical Engineering</i>
RFE	Radiofrequenzenergie
RMS	<i>Root-Mean-Square</i>
s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung
Sq	Rauheitsparameter, entspricht dem RMS
Tab.	Tabelle
vgl.	Vergleiche
W	Watt
WOMAC	<i>Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
<b>2. Theoretische Grundlagen .....</b>	<b>8</b>
2.1 Der Gelenkknorpel .....	8
2.1.1 Die Bestandteile des Knorpelgewebes – Knorpelzellen und Matrix .....	8
2.1.2 Struktur und Biomechanik des Gelenkknorpels .....	10
2.1.3 Knorpelregeneration .....	12
2.2 Radiofrequenzenergie (RFE) .....	13
2.2.1 Begriffsklärung .....	13
2.2.2 Historischer Hintergrund .....	14
2.2.3 Physikalisches Prinzip der RFE .....	15
2.2.4 Gegenüberstellung von monopolarer und bipolarer RFE .....	18
2.2.5 Anwendung in der Arthroskopie .....	21
2.3 Aktueller Stand der Forschung zur Chondroplastik durch bipolare RFE ....	23
<b>3. Fragestellungen und Zielsetzung der Studie .....</b>	<b>34</b>
<b>4. Materialien und Methoden .....</b>	<b>36</b>
4.1 Herstellen der Proben: Vorbereitung und Behandlung des Schweineknorpels .....	36
4.1.1 Live/Dead-Färbung .....	38
4.1.2 Caspase-Färbung .....	39
4.1.3 Silbernitratimprägnierung .....	40
4.2 Versuchsdurchführung .....	41
4.2.1 Messung der Oberflächenrauheit des Knorpels .....	41
4.2.2 Ermittlung des Anteils abgestorbener Knorpelzellen .....	46
4.3 Statistische Analyse .....	47



<b>5. Ergebnisse</b>	49
5.1 Der Glättungseffekt bipolarer RFE-Behandlung: Ergebnisse zur Rauheit des Knorpels	49
5.1.1 Effekte nach einmaliger Behandlung	52
5.1.2 Glättungseffekt nach Wiederholung der Behandlung	52
5.1.3 Abhängigkeit des Glättungseffekts vom Behandlungsmuster	53
5.2 Der Untergang der Knorpelzellen durch bipolare RFE-Behandlung	54
<b>6. Diskussion</b>	57
6.1 Eigene Ergebnisse im Kontext der aktuellen Studienlage	58
6.1.1 Der Glättungseffekt durch Anwendung bipolarer RFE	58
6.1.2 Untergang der Knorpelzellen als negativer Effekt bipolarer RFE-Behandlung	60
6.2 Methodik	64
6.3 Ausblick	68
<b>7. Zusammenfassung</b>	70
<b>8. Publierte Teilergebnisse dieser Arbeit</b>	71
<b>9. Anhang</b>	80
9.1 CLSM – Aufnahmen	80
9.2 Abbildungsverzeichnis	87
9.3 Tabellenverzeichnis	89
<b>10. Literatur</b>	90
<b>11. Danksagung</b>	

# 1. Einleitung

„Luft und Bewegung sind die eigentlichen Sanitätsräte.“

Theodor Fontane (1819-1898)

Gerade heute, wo die meisten Menschen ihren Alltag überwiegend sitzend verbringen, gewinnt das Zitat von Theodor Fontane an Bedeutung. Die Bewegung in Sport und Freizeit ist als Ausgleich zu sitzenden Tätigkeiten für das Wohlergehen des Menschen unentbehrlich. Sie leistet einen wichtigen Beitrag zur Gesundheit des Menschen. Grundvoraussetzung hierfür ist ein gut funktionierender Bewegungsapparat. Dazu zählen die Gelenke des menschlichen Körpers, die neben Muskeln, Sehnen, Bändern, sowie den Schleimbeuteln und Knochen unabdingbar für reibungslose Bewegungsabläufe sind [1, 2].

Diarthrotische Gelenke, welche hier vor allem wegen ihres großen Bewegungsausmaßes betrachtet werden, bestehen aus einer Gelenkhöhle, umgeben von einer Gelenkkapsel, und den Gelenkflächen [1, 3]. Die meisten Gelenkflächen werden aus hyalinem Knorpel gebildet. Alle biochemischen, aber auch biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels sind essentiell, um sowohl den Druck als auch die Scherkräfte, welche auf das Gelenk treffen, adäquat absorbieren und verteilen zu können [4].

Mit zunehmendem Alter steigt die Prävalenz einer Osteoarthrose mit degenerativen Veränderungen des Knorpels an [5–8]. Adipositas, sportliche und berufliche Belastungen, Traumata, Muskelschwächen, Gelenksfehlstellungen sowie die genetische Disposition begünstigen eine arthrotische Veränderung des Knorpels [7, 9–11]. Mit dem Alter nimmt der Wassergehalt des Knorpels aufgrund des Verlusts von Proteoglykanen ab, wodurch die Elastizität des Gewebes sinkt. Kollagenfibrillen verändern sich und die schützende Schicht der Knorpeloberfläche degeneriert. Es kommt zu Verkalkungen und Knorpelzelluntergang [12–14].

Hyaliner Gelenkknorpel kann sich selbst kaum regenerieren [3]. Eine Versorgung über Blutgefäße findet nur wenig bis gar nicht statt [2, 12, 15]. Ihre Nährstoffe erhalten die Knorpelzellen über Diffusion [12]. Bei Schäden der Gelenkfläche

funktioniert diese Art der Versorgung nur noch vermindert, was zu einer Progression des Schadens führt [15]. Die degenerativen Prozesse im Gelenkknorpel können zu Rissen im Knorpel führen. Als Reaktion auf die Ulzerationen entstehen durch den einsetzenden Reparaturmechanismus Faserknorpel und Granulationsgewebe. Mit einer dadurch verminderten Funktionalität des Knorpels steigt der lokal auf die Gelenkfläche einwirkende Druck an und führt zu weiteren Schäden. Freiliegende Proteoglykan- und Kollagenepitope im Gelenkraum führen zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren der Synovialmembran. Die reaktive Synovialitis bewirkt eine weitere Knorpelschädigung. Es kommt zu einem Circulus Vitiosus [1, 3, 16–21].

Nicht nur der Knorpel selbst ist von diesem fortschreitenden Prozess betroffen, sondern auch der darunterliegende Knochen ist gefährdet. Die ursprüngliche Verteilung der auf das Gelenk treffenden Belastung unterbleibt, sodass es zu Mikrofrakturen im subchondralen Knochen kommen kann. Die mit Entzündungsmediatoren angereicherte Synovialflüssigkeit kann in die entstandenen Hohlräume gelangen und zu Osteonekrose führen [18, 22].

Letztendlich suchen Patienten wegen der durch den Knorpelschaden bedingten Schmerzen und die damit einhergehende Bewegungseinschränkung des Gelenks einen Arzt auf. Das Ziel einer medizinischen Behandlung ist eine Verbesserung der Funktionalität des Gelenks, die Schmerzreduktion und die Verlangsamung oder gar Verhinderung weiterer Knorpeldegeneration [11, 23].

Je nach Konstitution des Patienten, den Umständen und der Ursache der Arthrose gibt es verschiedene Möglichkeiten, betroffene Patienten zu behandeln. Der Grad der Osteoarthrose kann makroskopisch nach der vierstufigen Outerbridge Klassifikation, erweitert durch die Klassifikation der *International Cartilage Research Society* (ICRS), bestimmt werden (vgl. Tab. 1) [24, 25].

**Tabelle 1: Outerbridge Klassifikation von Knorpeldefekten, erweitert durch die Klassifikation der International Cartilage Research Society (ICRS), Osteoarthritis Grad I - IV [24–27]**

Grad	Kennzeichen der Läsion
I	Erweichung und Schwellung des Knorpels <b>ICRS 1a:</b> Oberfläche intakt, Fibrillationen <b>ICRS 1b:</b> Oberflächliche Fissuren
II	<b>ICRS 2:</b> Auffaserung des Knorpels, Einrisse und Fibrillationen Defekttiefe < 50 % der Knorpelschicht
III	Risse bis in die Tiefe, noch oberhalb des subchondralen Knochens, Defekttiefe > 50 % der Knorpelschicht ( <i>partial thickness defect</i> ) <b>ICRS 3a:</b> Oberhalb der kalzifizierenden Schicht <b>ICRS 3b:</b> Bis zur kalzifizierenden Schicht <b>ICRS 3c:</b> Bis zur subchondralen Platte <b>ICRS 3d:</b> Mit Blasenbildung
IV	<b>ICRS 4:</b> Erosion bis in den subchondralen Knochen mit Durchbruch der subchondralen Platte ( <i>full thickness defect</i> )

Bei geringem Knorpelschaden greift man zu konservativen Mitteln [25]. Bei Gelenken der unteren Extremität spielt eine Gewichtsreduktion zur Besserung der Beschwerdesymptomatik eine große Rolle [28]. Allgemein wird das Schonen des betroffenen Gelenks bei akuter Symptomatik empfohlen [29, 30]. Durch die topische Anwendung von Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) und die orale Gabe der NSARs können Schmerzen gelindert werden [8, 30]. Bei Bedarf kann auch auf Opioide je nach Konstitution des Patienten zurückgegriffen werden [25]. Eine Injektion von Corticosteroiden in das betroffene Gelenk kann kurzfristig zu einer

Linderung der Symptomatik führen. Supportiv können Physiotherapie, Ergotherapie und Methoden aus der Physikalischen Medizin sowie aus der Naturheilkunde eingesetzt werden [25].

Zur operativen Behandlung einer lokal abgrenzbaren Früharthrose sowie fokaler traumatischer Knorpelverluste bestehen derzeit Forschungsansätze, die auf eine Regeneration oder Reparatur des Knorpelgewebes setzen. Aktuell empfohlen werden dafür die Mikrofrakturierung, die matrixaugmentierte Knochenmarkstimulation, die Autologe Chondrozytenimplantation und die Autologe oder Allogene Osteochondrale Transplantation [11, 25, 31–35].

Bleiben alternative Behandlungsmethoden erfolglos, muss das Gelenk ersetzt, versteift oder Gelenksanteile reseziert werden [25, 36].

Eine degenerative Osteoarthrose Grad II und III nach Outerbridge (vgl. Tab. 1) wird zur Symptumlinderung im Rahmen einer Arthroskopie häufig debridiert [32, 37]. Ziel des arthroskopischen Debridements ist es, defektes Knorpelgewebe abzutragen und eine plane Gelenkfläche inklusive glatter Ränder zur Umgebung des Defektes herzustellen. Dabei soll umliegendes gesundes Gewebe möglichst unbeschadet bleiben. Bei Läsionen vom Grad IV kann man durch die Chondroplastik lediglich die Ränder des Defektes stabilisieren, ohne Evidenz für die Effektivität der Maßnahme zu haben [17].

Traditionell nutzt man dazu einen mechanischen Shaver. Es ist damit aber schwierig, einen stabilen Rand zu erzeugen und gleichzeitig die Umgebung unbeschadet zu lassen. Gerade in kleinen Gelenkräumen erweist sich diese Methode als unpräzise und entsprechend anspruchsvoll für den Operateur. Umliegendes gesundes Gewebe wird häufig mit abgetragen und weiterer Knorpel degeneriert [38–42].

Um die negativen Effekte der Knorpelbehandlung zu vermeiden, hat man versucht, den Knorpel mit Holmium-Yttrium-Aluminum-Garnet-Lasern zu behandeln. Jedoch haben sich diese wegen des schwierigen Gebrauches, der viel höheren Kosten und der Erzeugung von irreversiblen Schäden an Knochen und Knorpel nicht bewährt [43–45].

Eine weitere Möglichkeit zur arthroskopischen Behandlung des Knorpeldefektes stellt die Radiofrequenzenergie (RFE) dar. Hiervon verspricht man sich eine Behandlungsmethode, welche den Knorpel ohne die genannten negativen Effekte des mechanischen Shavers glättet [20, 39, 40, 46]. Bei der Glättung des Knorpels beendet der Operateur seine Behandlung in der Regel durch die subjektive visuelle Beurteilung der Knorpeloberfläche. Zudem geht man davon aus, dass der Teufelskreis der Knorpeldegeneration gestoppt wird. Die Versiegelung der Knorpeloberfläche durch die RFE minimiert das Freiliegen von Epitopen der Knorpelmatrix [17–20, 47]. Entzündungsmediatoren werden weniger in die Gelenkflüssigkeit ausgeschüttet [19, 21]. Jedoch ist bewiesen, dass diese Methode einen Knorpelzelluntergang als negative Auswirkung mit sich bringt. Die Anwendung der RFE wird daher kontrovers diskutiert [19, 25, 42, 47–51].

In der Handgelenksarthroskopie, bei der man einen besonders kleinen Gelenkraum vorfindet, wird die RFE gerade wegen des handlichen Gebrauchs und der präzisen Anwendung sowohl für die Synovektomie, das sogenannte *Shrinkage* für Kapsel-Band-Strukturen als auch für die thermale Chondroplastik verwendet. Das geringe Volumen des Gelenkraums birgt ein besonders hohes Risiko für den Knorpelzelluntergang durch eine RFE-Behandlung, da die dabei entstehenden Temperaturen höher als gewünscht ausfallen können [23, 52]. Zudem ist der Knorpel im Handgelenk besonders dünn, was auch eine höhere Gefahr des Knorpelzelluntergangs mit sich bringt [23, 53, 54].

Trotz kontroverser Studienlage werden die RFE-Geräte derzeit in der Arthroskopie angewendet. Es bedarf weiterer Forschung, welche konkretere Aussagen über die langfristigen Folgen einer RFE-Behandlung zulässt und Klarheit über die schädlichen Nebeneffekte schafft.

Ziel dieser Studie ist es, verschiedene Anwendungsweisen bipolarer Radiofrequenzenergie einander gegenüberzustellen. Es wird jeweils das Ausmaß der Glättung der Knorpeloberfläche als positiver Effekt der Behandlung sowie der Knorpelzelltod als negativer Effekt untersucht. Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit

wurden im Biomed Research International 2020 veröffentlicht [55]. Das publizierte Paper ist im Anschluss an die Arbeit in einem eigenen Gliederungspunkt einsehbar.

## **2. Theoretische Grundlagen**

### **2.1 Der Gelenkknorpel**

Knorpelgewebe ist eine Form von Bindegewebe, welche eine besondere Stützfunktion für den menschlichen Körper darstellt. Grundsätzlich wird histologisch zwischen vier verschiedenen Arten des Knorpelgewebes unterschieden. So gibt es fetalen Knorpel, elastischen Knorpel, hyalinen Knorpel und Faserknorpel [12]. Aus dem Mesenchym entstehend, spielt fetaler Knorpel in der Embryonalentwicklung eine wichtige Rolle, da der Großteil des Knochenskeletts zunächst in dieser Bindegewebsform angelegt wird. Im späteren Verlauf der Entwicklung des menschlichen Körpers ist Knorpel in seinen weiteren Formen je nach Lokalisation und seiner entsprechenden Funktion zu finden.

Die meisten Gelenkflächen des menschlichen Körpers werden aus hyalinem Knorpel gebildet, nur wenige Gelenkflächen (z.B. Sternoklavikulargelenk, Kiefergelenk) bestehen aus Faserknorpel [3]. Im Folgenden wird daher auf diese beiden Formen des Knorpelgewebes eingegangen.

#### **2.1.1 Die Bestandteile des Knorpelgewebes – Knorpelzellen und Matrix**

Knorpelzellen und Matrix stellen die zwei Hauptbestandteile des hyalinen Knorpels dar. Die Knorpelzellen, welche, solange sie noch teilungsfähig sind, Chondroblasten genannt werden und Chondrozyten, sobald deren Mitose sistiert, machen lediglich zwei Prozent des Knorpelgewebes aus [31]. Knorpel ist frei von Nerven und enthält nur selten Blutgefäße [2, 15]. Dementsprechend weist der Stoffwechsel der Knorpelzellen Besonderheiten auf. Die Nährstoffzufuhr im Knorpelgewebe beruht auf Diffusion und anaeroben Stoffwechsel [12]. Sehr selten kommt es zur

Kommunikation über Zell-Zell-Kontakte. Die Knorpelzellen reagieren auf chemische und mechanische Einflüsse in ihrem Umfeld [2, 12, 56].

Da mehrere Knorpelzellen aus der mitotischen Teilung einer Mutterzelle entstehen, findet man sie meist in Knorpelzellgruppen angeordnet [12]. Umgeben von einem Knorpelhof, welcher Glukosaminoglykane enthält, nennt man diese Anordnung ein Chondron.

Die extrazelluläre Knorpelmatrix wird von den Knorpelzellen produziert [6, 31, 57]. Diese nimmt den größten Teil des Knorpelgewebes ein und wird mit den Knorpelzellen durch Chondronectin, welches sich in deren Membran befindet, sowie durch Kollagen Typ VI verbunden [12, 56]. Die einzelnen Bestandteile der Matrix bestimmen die Funktionalität des Knorpels [6, 58–60].

Der Komplex aus den ungeformten Matrixkomponenten Hyaluronsäure und dem Proteoglykan Aggrecan bindet Wasser (80 % des Knorpelgewebes), wodurch der Knorpel seine prallelastische Konsistenz erhält [12, 57].

Zu den geformten Komponenten der Matrix zählen Kollagen (Typ II, VI, IX, X, XI), sowie verschiedene Glykoproteine [12, 56–59]. Der Grundaufbau jedes Kollagens ist gleich. Eine rechtsgängige Kollagentripelhelix besteht aus drei linksgängigen Kollagen-Helices, welche über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind. Die Tripelhelices sind untereinander über Schiff-Basen verbunden [58].

Das Kollagen Typ II bildet mit dem Kollagen Typ XI dünne Fibrillen und ist der wichtigste Kollagentyp im hyalinen Knorpel. Zudem umgibt das Kollagen Typ XI hypertrophe Knorpelzellen. Das Kollagen Typ IX bindet an Typ II, wodurch dieses seinen hydrophilen Charakter erhält [12, 58]. Das Kollagen Typ X ist besonders in kalzifizierenden Schichten des Knorpels zu finden [61].

Hyaliner Knorpel degeneriert im Alter häufig. Die Matrixbestandteile verändern sich, der Wassergehalt nimmt ab und Knorpelzellen sterben [14]. Die Regeneration kann nur sehr eingeschränkt vom Perichondrium ausgehen [12].

In nur wenigen Gelenken besteht die Gelenkfläche aus Faserknorpel (z.B. Kiefergelenk, Sternoklavikulargelenk). Faserknorpel enthält zusätzlich das Kollagen Typ I, was eine besondere Festigkeit des Gewebes bewirkt [12, 61].



### 2.1.2 Struktur und Biomechanik des Gelenkknorpels

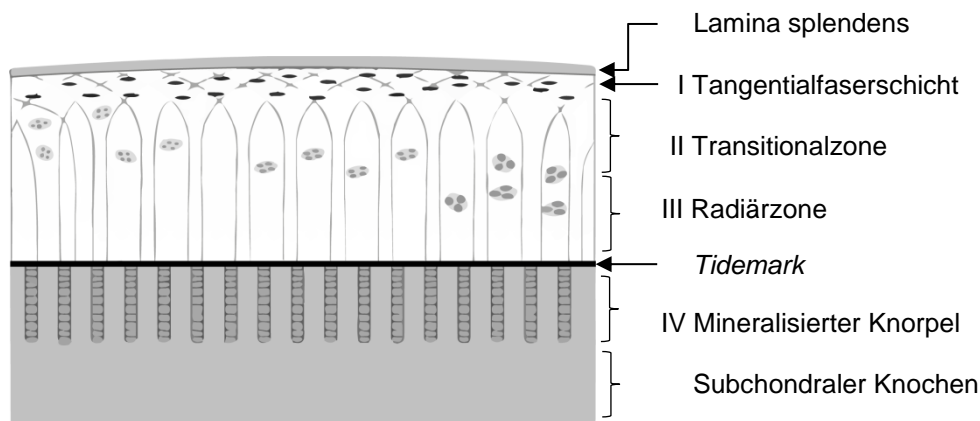
Die glatte Gelenkfläche wird durch den Gelenkknorpel gebildet. Die Dicke der Knorpelschicht ist je nach Gelenkgröße sowie dessen Beanspruchung unterschiedlich ausgeprägt und variiert zwischen einem und fünf Millimetern [2, 3, 11, 62–66].

Damit eine Bewegung reibungslos ablaufen kann, spielt die Glattheit der Knorpeloberfläche eine große Rolle [2]. Zudem hat der Gelenkknorpel wichtige mechanische Eigenschaften, damit die auf das Gelenk treffende Last optimal aufgenommen und verteilt werden kann. Durch die arkadenförmige Anordnung der Kollagenfibrillen kann man verschiedene Schichten des Gelenkknorpels differenzieren (vgl. Abb. 1) [3].

An der Oberfläche befindet sich die Tangentialfaserschicht sowie die darüber liegende Lamina splendens [3, 13, 67]. In der Tangentialfaserschicht verlaufen die Kollagenfibrillen schräg bis parallel zur Oberfläche. In der davon abgrenzbaren Membran darüber (Lamina splendens) finden sich komplex miteinander verwobene Kollagenfibrillen, die den Zug- und Scherkräften aus allen Richtungen standhalten [13]. Diese Schicht ist unerlässlich für den Schutz des Knorpelgewebes sowie der Knorpelzellen [13, 31]. Auch die Chondrozyten sind entsprechend angeordnet und sehr flach. Die Neubildung des Knorpelgewebes erfolgt in dieser Schicht [3].

Durch den bogenförmigen Verlauf der Kollagenfasern kreuzen sich diese in der Transitionalzone. Hier wirken sowohl Scher- als auch Druckkräfte auf die Fibrillen. Darunterliegend befindet sich die Radiärzone. Dort verlaufen die Kollagenfasern senkrecht zur Oberfläche, um der Druckkraft standhalten zu können. Dazwischen sind Knorpelzellen in Chondronen zu finden.

In der Tiefe findet man die lichtmikroskopisch sichtbare sogenannte *Tidemark*, die besonders calciumreich ist, und einen mineralisierten Knorpel. In dieser speziellen Schicht verbindet sich das Knorpelgewebe mit dem Knochengewebe. Dort sind nur wenige Knorpelzellen vorhanden. Wichtig ist die Verzahnung mit dem darunterliegenden Knochen, damit sowohl ein Abscheren des Knorpels vom Knochen verhindert wird, als auch die Druckübertragung auf den Knochen optimiert wird [3, 31].



**Abbildung 1: Skizze der Knorpelschichten: Lamina splendens, Tangentialfaserschicht (I), Transitionalzone (II), Radiärzone (III), Tidemark, Mineralisierter Knorpel (IV), dazwischen Knorpelzellen (schwarze Punkte) und Chondrone (grau); oben: Knorpeloberfläche, unten: Subchondraler Knochen**

Die Kollagenfibrillen geben dem Knorpel eine feste Struktur und halten das Knorpelgewebe zusammen. Die Proteoglykanaggregate bilden mit Wasser einen riesigen Molekülkomplex, welcher dem hyalinen Gelenkknorpel seine typische elastische formstabile Konsistenz gibt [12]. Da die Glukosaminoglykanseitenketten (GAGs), welche Bestandteil der Proteoglykane sind, Wasser anziehen, kommt es zu einem Quellungsdruck im Knorpelgewebe, der dem von außen auf den Knorpel einwirkendem Druck entgegenwirkt.

Bei starker Belastung des Gelenkknorpels entweichen Wasser und Ionen aus dem Gewebe. Die Zellen und die geformten Komponenten der extrazellulären Matrix nähern sich an. Das Gewebe wird verdichtet, was zu einer sinkenden Permeabilität führt, sodass die restliche Flüssigkeit und darin enthaltene Ionen immer weniger abfließen können [68]. Die GAGs stoßen sich aufgrund ihrer negativen Ladungen voneinander ab und wirken dadurch der starken Kompression entgegen. Wird die Belastung aufgehoben, so quillt der Knorpel wieder an. Die Abstoßung der GAGs sowie das Eindringen von Flüssigkeit und Ionen bringen den Gelenkknorpel auf sein Ursprungsvolumen zurück bis das straffe Kollagennetz die Ausdehnung wieder begrenzt. Wo die GAGs das Gewebe auseinandertreiben, halten die Kollagenfibrillen dieses zusammen und befinden sich somit in einer Vorspannung. Ohne das strukturierte Netz aus Kollagenfasern würde der Knorpel ein fünffaches an Volumen erreichen [13, 69].

### **2.1.3 Knorpelregeneration**

Da adulter Knorpel keine Blutgefäße enthält, ist die Regenerationskraft des Knorpelgewebes sehr eingeschränkt [2, 15].

Findet eine Schädigung des Knorpels oberflächlich statt, so kann der Defekt nicht vom Körper selbst repariert werden. Bereits kleine Schäden an der Knorpeloberfläche verändern das Kollagengerüst und somit die Funktionsfähigkeit des Knorpels [13]. Auch können Chondrozyten davon Schaden nehmen, wodurch ihre metabolische Funktion zur Aufrechterhaltung der Matrix beeinträchtigt wird [6]. Zwar produzieren die noch vorhandenen Chondrozyten vermehrt die extrazelluläre Matrix, allerdings nicht in dem zur vollständigen Reparatur nötigen Ausmaß. Meist kommt es zu einem Fortschreiten der Knorpeldegeneration und zur Arthrose [15, 31].

Wird der Knorpel bis in die Tiefe geschädigt, sodass auch subchondraler Knochen betroffen ist, findet eine Reparaturreaktion statt. Über den Knochen ist der Zugang zu Zellen und Blut gewährleistet. Hierbei entsteht Faserknorpel, welcher zwar den Defekt füllt, aber nicht die Eigenschaften des hyalinen Knorpels besitzt und anfälliger für weitere degenerative Veränderungen ist [70].

Die eingeschränkte Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels ist zentrales Thema bei der Behandlung von Knorpeldefekten, da der komplexe Aufbau des Gelenkknorpels für dessen Funktionalität unverzichtbar ist [60].

## **2.2 Radiofrequenzenergie (RFE)**

Eine Möglichkeit zur arthroskopischen Behandlung von Knorpeldefekten II. und III. Grades (vgl. Tab. 1) stellt die Anwendung von Radiofrequenzenergie (RFE) dar. Ein Verständnis über den Wirkmechanismus der RFE und deren Effekte am menschlichen Körper ist unabdingbar, wenn man sich mit deren Anwendung kritisch auseinandersetzen möchte. Der Einsatz der RFE ist wegen ihrer Auswirkungen noch immer umstritten. Im Folgenden werden wichtige Aspekte der RFE erläutert.

### **2.2.1 Begriffsklärung**

Radiofrequenzenergie ist eine Form der Elektrochirurgie. Zunächst versteht man unter dem Oberbegriff Elektrochirurgie jeglichen Gebrauch von (Wechsel-)Strom im Feld der operativen Medizin. Über Elektroden wird dabei Strom an das Gewebe abgegeben. Dieser verursacht dort molekulare Bewegungen, wodurch es sekundär zu einer thermischen Wirkung kommt [17, 71, 72]. Angewendet wird die Methode zur Ablation, Koagulation und zum Schneiden von Gewebe [73, 74]. Wegen der dabei hohen Frequenzen von bis zu 2.5 GHz begegnet einem auch häufig der Begriff Hochfrequenzchirurgie [17, 73]. Da sich Hörfunk-Radiowellen mit diesem Frequenzbereich überlappen, ist letztendlich die Bezeichnung Radiochirurgie und Radiofrequenzenergie entstanden [17, 75].

Unterschieden wird dabei zwischen mono- und bipolarer RFE. Der Strom fließt bei monopolarer RFE von einer Elektrode durch den Körper des Patienten zu einer ableitenden Elektrode, die an anderer Stelle des Körpers angebracht ist.

Bei bipolarer RFE sind beide Elektroden an der Spitze der RFE-Sonde angebracht. Somit begrenzt sich der Stromfluss auf das lokal behandelte Gewebe [73, 76].

### 2.2.2 Historischer Hintergrund

Therapeutische Wärme zählt zu einer der ältesten Behandlungsmethoden im Bereich der Medizin. Ein Zitat von Hippokrates deutet auf die Anwendung von Wärme in der Medizin bereits in der Antike hin:

*„Krankheiten, die Arzneimittel nicht heilen, heilt das Messer, die das Messer nicht heilt, heilt das Feuer, die das Feuer nicht heilen kann, die muss man als unheilbar betrachten.“*

Heutzutage gibt es verschiedene Anwendungen von Wärme in der Medizin. Statt dem Feuer selbst ermöglicht der Einsatz von hochfrequentem Strom, verschiedene Gewebe des menschlichen Körpers mit Wärme zu behandeln.

Die Anwendung von hochfrequentem Strom entwickelte sich aus Erkenntnissen von Galvani und Nernst [77]. Es ist nachgewiesen, dass die Anwendung von Gleichstrom und niederfrequentem Wechselstrom am menschlichen Organismus zu einer Reizung von Nervenzellen führen kann. Ein Anstieg der Stromstärke führt zur Erhöhung der Reizwirkung. Bei gleichbleibender Stromstärke verringert sich die Reizwirkung mit steigender Frequenz. Ab einer Frequenz von über 200 - 300 kHz geht man von einer Reizfreiheit aus. Dann kann auch die Stromstärke gesteigert werden, was für die Wärmewirkung notwendig ist, ohne dabei Reizerscheinungen zu verursachen.

Während D'Arsonval Ende des 19. Jahrhunderts in seinen Experimenten mit Hochfrequenzenergie die Wärme noch als lästigen Nebeneffekt bemerkte, wurde 1904 die thermische Wirkung durch die Anwendung von Strom in der Medizin bereits als wichtig erachtet. Bald schon wurden Lichtbögen zur Behandlung von Arthritiden eingesetzt, welche in Folge von Diathermieapparaten abgelöst wurden. Diathermieapparate ermöglichen es, Gleichstrom oder niederfrequenten Wechselstrom in hochfrequenten Wechselstrom umzuwandeln. Daraufhin wurden verschiedene Verfahren für die Medizin entwickelt, welche die Wärmeentstehung der Hochfrequenzenergie nutzten. Die Wirkung der Hochfrequenzenergie und die aus ihr resultierende Wärmewirkung wurde immer mehr erforscht [78].

Radiofrequenz-Chirurgie speziell kommt bei Gewebetrennung und Blutstillung zum Einsatz [74]. Im Bereich der Unfallchirurgie und Orthopädie nutzt man den thermischen Effekt vor allem arthroskopisch, um Gewebe zu straffen, abzutragen oder Knorpel zu glätten.

### **2.2.3 Physikalisches Prinzip der RFE**

Zur Anwendung von Radiofrequenzenergie benötigt man eine von einem Generator erzeugte Spannung zwischen zwei Polen. Diese zwei Pole bestehen aus einer Aktivelektrode und einer ableitenden Neutralelektrode.

Behandelt wird mit Wechselstrom einer Frequenz von mindestens 200 kHz und bis zu 2.5 GHz [73], sodass die durch eine niedrigere Frequenz (50 – 60 Hz) entstehende neuromuskuläre Erregung verhindert wird [77].

Bei der Behandlung mit RFE macht man sich den thermischen Effekt von Strom zu Nutze. Mit steigender Frequenz nimmt die elektrische Leitfähigkeit des Gewebes zu. Die Erwärmung des Gewebes resultiert aus Leitungs- und Verschiebungsströmen. Freie Elektronen und Ionen sind verantwortlich für die Leitung des Stroms im Gewebe. Sie werden durch den Stromfluss zwischen den zwei Elektroden und durch das daraus resultierende elektromagnetische Feld aktiviert. Bei ihrer raschen molekularen Bewegung verlieren sie Energie durch Reibung, die sich als Wärme bemerkbar macht [17, 72, 79].

Ist die Leitfähigkeit des Gewebes sehr klein, spielt der Leitungsstrom nur eine kleine Rolle. Die entstehende Wärme beruht dann vor allem auf Verschiebungen der Elektronen in den Atomorbitalen der jeweiligen Materie, was wiederum zu Wärme führt [79].

Das Ausmaß der entstehenden Wärme ( $\Delta Q$ ) wird mit dem Joule-Gesetz beschrieben:

$$\Delta Q = k \times I^2 \times R \times \Delta t$$

Die Wärme  $\Delta Q$  ist von der Stromstärke  $I$ , der Einwirkzeit  $\Delta t$  und dem Gewebswiderstand  $R$ , welcher vor allem auf dem Flüssigkeitsgehalt des Gewebes beruht, abhängig.  $k$  ist eine Konstante von 0.24, sofern  $I$  in Ampere,  $R$  in Ohm und  $\Delta t$  in Sekunden angegeben werden [17, 80].

Da die Leitfähigkeit und Stromdichte (Verhältnis von Stromstärke zur Fläche) elektrodennah am höchsten ist, ist dort die Wärme als gewünschte Wirkung am größten [18, 81].

Bei vollständiger Energieumwandlung kommt es bei einer behandelten Masse  $m$  mit ihrer spezifischen Wärmekapazität  $c$  zur entsprechenden Temperaturerhöhung  $\Delta T$ :

$$\Delta T = \frac{\Delta Q}{m \times c} \quad [79, 80]$$

Dabei ist es wichtig, zu berücksichtigen, dass die spezifische Wärmekapazität  $c$  für die verschiedenen Gewebe unterschiedliche Werte annimmt. Entsprechend kann die Temperaturerhöhung trotz gleicher Umstände in jedem Gewebe unterschiedlich ausfallen [79].

Des Weiteren beeinflussen auch die Zusammensetzung der Spülflüssigkeit und der Abstand  $r$  zwischen Elektrode und Gewebe die Wärmewirkung. Die Wärme nimmt dabei um den Faktor  $\frac{1}{r^4}$  ab [82].

Bei menschlichem Gewebe ist eine exakte Berechnung der Temperaturerhöhung durch eine RFE-Behandlung in vivo mittels dieser Formeln nicht möglich. Eine Kenntnis der Abhängigkeiten ist jedoch notwendig, um die RFE adäquat einsetzen und deren Auswirkungen auf das Gewebe möglichst abschätzen zu können [79, 80].

Im Folgenden wird auf die Wirkung der Wärme speziell auf das Knorpelgewebe bei der Knorpelglättung durch RFE eingegangen.

Mit der RFE-Behandlung wird die Anordnung des Kollagens im Knorpelgewebe und somit die Gewebsstruktur verändert. Dadurch wird die mechanische Stabilität des bereits geschädigten Knorpels positiv beeinflusst [18].

Bei Temperaturen zwischen 60 °C und 80 °C entwindet sich laut Owens et al. die Tripelhelix des Kollagens durch das Brechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den einzelnen Helices [39]. Beim Abkühlen kommt eine weniger organisierte Struktur der Kollagenstränge durch neue Wasserstoffbrückenbindungen zustande. Die Orientierung und Länge der Kollagenfasern ändern sich.

Bei gesundem Gelenkknorpel findet man oberflächlich eine tangentiale Ausrichtung der Kollagenfasern, welche sehr wichtig für die Verteilung der einwirkenden Kräfte ist. In der darunterliegenden Schicht ist das Kollagen perpendikular angeordnet [3, 13]. Während der oben beschriebenen Umstrukturierung des Kollagens wurde beobachtet, dass vor allem unterhalb einer beschädigten Tangentialzone eine Neuorientierung der Kollagenfasern parallel zur Gelenkfläche stattfindet und dadurch eine sogenannte *Neosurface* entsteht. Auch wenn diese nicht exakt dieselben Eigenschaften besitzt, wie die originale Tangentialfläche darüber, so entsteht möglicherweise dennoch eine stabilere Schicht, die durch die tangentiale Ausrichtung der Kollagenfasern den ursprünglichen mechanischen Eigenschaften der Tangentialfaserschicht nahe kommt [39].

Die Umstrukturierung der Kollagenfasern durch RFE bewirkt die gewünschte Glättung des Knorpels. Das Verschmelzen der Fibrillen führt zur Versiegelung der Knorpeloberfläche. Die Permeabilität des Knorpelgewebes sinkt, sodass der mit der Chondromalazie einhergehende Verlust von Wasser minimiert werden kann [18, 42]. Epitope von frei liegenden Kollagenen und Proteoglykanen werden durch die Versiegelung derart reduziert, dass die durch die Synovia verursachte Entzündungsreaktion minimiert wird [17–20]. Laut Yasura et al. wird zudem ein Fortschreiten der Arthrose dadurch verhindert, dass Matrix-Metalloproteinasen, welche für den Abbau der Knorpelmatrix, insbesondere des Kollagens, verantwortlich sind, durch die einwirkende RFE reduziert werden [21].

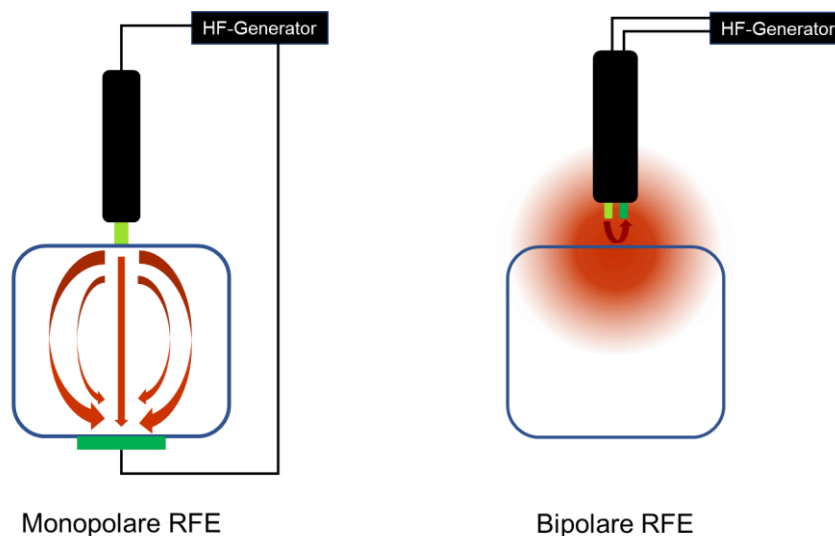
Bei einer höheren einwirkenden Temperatur (> 100 °C) werden die Kollagenmoleküle vollständig zerstört, ab 110 °C kommt es zur Verdampfung des Gewebes. Eine Weiterleitung der Energie im Gewebe ist durch den entstehenden Dampf dann kurzfristig nicht mehr möglich [83].



Arthrotischer Knorpel reagiert früher auf Temperaturänderungen und morphologische Veränderungen treten bereits bei niedrigeren Temperatureinwirkungen auf als bei gesundem Knorpel. Dies wurde in einer Studie von Kaplan et al. festgestellt [84]. Arthrotischer Knorpel wies bereits bei Temperaturen um 56.5 °C morphologische Veränderungen auf, gesunder Knorpel erst bei Temperaturen um 60.9 °C. Die unterschiedliche Reaktion des Gewebes auf die einwirkende Wärme je nach Zustand des Knorpels sollte man stets bedenken.

## 2.2.4 Gegenüberstellung von monopolarer und bipolarer RFE

Allgemein unterscheidet man bei den Geräten, welche für die Knorpelglättung verwendet werden, zwischen der Anwendung von monopolarer und bipolarer RFE (vgl. Abb. 2).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Anwendung monopolarer RFE (links) und bipolarer RFE (rechts); Hellgrün: Aktivelektrode, Dunkelgrün: Ableitende Elektrode, Blau: behandeltes Gewebe, Rote Pfeile: Stromfluss, Hochfrequenz(HF)-Generator  
**Monopolare RFE:** direkter Kontakt der Aktivelektrode zum Gewebe, Stromfluss durch das Gewebe zur Neutralelektrode  
**Bipolare RFE:** Abstand der Elektroden zum Gewebe, Behandlung durch erzeugtes Plasmafeld, lokal begrenzter Stromfluss

Bei monopolarer RFE ist ein direkter Kontakt der Aktivelektrode zum zu behandelnden Gewebe nötig (vgl. Abb. 2). Bei der Anwendung des monopolaren Gerätes muss daher auf einen adäquaten Druck und eine vorsichtige Bewegung der Elektrode geachtet werden, um das Gewebe nicht zu schädigen. Die viel größere ableitende Neutralelektrode ist an einer anderen Stelle des Körpers anzubringen.

Der Strom fließt von der aktiven Elektrode durch den Körper des Patienten zur Neutralelektrode, was in Abbildung 2 über rote Pfeile symbolisch dargestellt wird. Der Strom nimmt den Weg des geringsten Widerstandes. Dementsprechend beschränkt sich der Stromfluss nicht nur auf die zu behandelnde Region, sondern involviert auch andere Bereiche des Körpers, welche Schaden nehmen könnten. Auch elektrische Geräte am Körper, wie Herzschrittmacher, können beeinträchtigt werden [17, 76].

Die durch die zugeführte Energie entstehende Wärme konzentriert sich wegen der kleinen Auflagefläche auf den Bereich vor der aktiven Elektrode. Im Bereich der großflächigen Neutralelektrode liegt nur eine geringe Stromdichte vor [76].

Dagegen befinden sich bei der bipolaren RFE-Sonde, welche im Fokus dieser Studie steht, zwei Elektroden direkt an der Spitze des Geräts. Der Strom fließt von der Aktivelektrode zur ableitenden Elektrode. Eine Neutralelektrode an anderer Stelle des Körpers ist bei dieser Anwendung nicht nötig. Es entsteht ein starkes lokal konzentriertes Plasmafeld aus ionisierten Teilchen, welches die Instrumentenspitze wolkenartig umgibt, sodass bei der Behandlung mit einer bipolaren Elektrode kein direkter Kontakt zum Gewebe nötig ist. Um eine Übertragung der Energie an das Gewebe zu gewährleisten, ist eine leitende Spülflüssigkeit notwendig. Die ionisierten Teilchen sind fähig, molekulare Bindungen im Gewebe aufzubrechen. Dadurch wird ein Abtragen von Gewebe möglich [19].

Ein Vorteil bipolarer RFE ist, dass sich der Stromfluss lokal auf das zu behandelnde Gewebe begrenzt und nicht unkontrolliert in alle Richtungen fließt. Dadurch ist die Anwendung mit geringerer Leistung möglich [76, 81]. Der Widerstand des Gewebes bestimmt die nötige Menge an Strom. Aufgrund des geringen Abstands der zwei Elektroden zueinander ist bei bipolarer RFE-Anwendung weniger Strom nötig als bei monopolarer RFE [85]. Da kein direkter Kontakt der Sonde zum Gewebe nötig ist, ist die Gefahr für Verletzungen durch die Sonde selbst sehr gering.

Die Hitze, welche in beiden Fällen durch ein elektromagnetisches Feld erzeugt wird, ist für die gewünschte Knorpelglättung verantwortlich.

In einer Studie von Lu et al. verglich man den Glättungseffekt beider RFE-Anwendungen [48]. Mit monopolarer RFE benötigte man fünf Sekunden für eine sichtbare Knorpelglättung, während die Behandlung mit bipolarer RFE erst zu späterem Zeitpunkt den gewünschten Effekt zeigte. Dies mag auf der Tatsache beruhen, dass bei bipolarer RFE zuerst die Spülflüssigkeit erhitzt werden muss, um eine entsprechend hohe Temperatur im Knorpel für dessen Glättung zu erreichen.

Die bei der RFE-Behandlung entstehende Hitze ist ein potentiell schädlicher Faktor für die Knorpelzellen [53, 86–90]. Man unterscheidet zwei Arten von Zelluntergang, die durch Hitzeeinwirkung verursacht werden können.

Die Apoptose ist ein Programm der Zelle für den kontrolliert ablaufenden Zelluntergang. Die auf die Zelle einwirkende Hitze kann ein extrinsischer Trigger dafür sein. Auswirkungen auf die Zelle sind noch mehrere Tage nach der Hitzeeinwirkung möglich.

Die Nekrose dagegen ist das unkontrollierte Absterben einer Zelle durch ein Trauma wie z.B. bei direkter Schädigung der Zellmembran. Auch dies kann die Folge einer Hitzeeinwirkung sein [91].

In einer Studie von Edwards et al. mit Rinderknorpel fand man bei bipolarer Behandlung nach gleicher Behandlungsdauer und in gleicher Tiefe im Vergleich zu monopolarer RFE bis zu 30°C höhere Temperaturen vor [54].

Auch bei der Temperaturmessung am Handgelenk während der Behandlung des Knorpels mit monopolarer und bipolarer RFE, fand man in einer Studie von Huber et al. heraus, dass die Höchsttemperaturen bipolarer RFE (69.21°C) die der monopolaren RFE (49.35°C) übertrafen [23].

In einem Vergleich von verschiedenen Anwendungstechniken monopolarer und bipolarer RFE verursachte die bipolare RFE in 78 – 92 % tieferen Gewebsschichten einen Knorpelzelluntergang als die monopolare RFE. Der Untergang von Knorpelzellen trat bei bipolarer RFE zudem häufiger auf [19, 48].

In einer Studie von Edwards et al., welche ex vivo an Knorpelproben von Patienten mit Chondromalazie II. und III. Grades nach Outerbridge durchgeführt wurde, fand

man nach bipolarer Behandlung eine deutlich höhere Anzahl toter Knorpelzellen bis zur Grenze zum subchondralen Knochen [47].

Die geringere Eindringtiefe und Temperaturen, sowie die verminderte Häufigkeit eines Untergangs von Knorpelzellen weisen Vorteile der monopolaren RFE-Behandlung auf.

Nachteilig ist jedoch, dass der Stromfluss im Gegensatz zu bipolarer RFE nicht lokal begrenzt ist und ein direkter Kontakt zu dem bereits erweichten Knorpel nötig ist [17, 76]. Zudem benötigt die Anwendung monopolarer RFE mehr Leistung [18].

Eine flächige Behandlung ist mit bipolarer RFE durch das entstehende Plasmafeld besser möglich. Laut Wienecke et al. wird die bipolare RFE bei der Knorpelglättung häufig bevorzugt [17]. Die Frage jedoch, welche Methode schonender ist, ist nicht endgültig geklärt. In dieser Studie wurden sowohl positive als auch negative Effekte der bipolaren RFE-Behandlung untersucht und stellen das zentrale Thema dieser Arbeit dar.

### **2.2.5 Anwendung in der Arthroskopie**

Elektrochirurgische Methoden haben in vielen Bereichen der Medizin ihre Anwendung gefunden. Im Bereich der Unfallchirurgie sowie der Orthopädie wird Radiofrequenzenergie bei arthroskopischen Behandlungen angewendet. Begonnen mit der Anwendung bei Kniegelenksarthroskopen hat sie sich mittlerweile für den Einsatz in verschiedensten Gelenken etabliert.

Neben der Unterscheidung zwischen bipolarer und monopolarer RFE kann man bei der Anwendung der Geräte zudem verschiedene Modi zur Behandlung des Gewebes unterscheiden. Ein Gerät kann im Schneide-Modus, Koagulationsmodus sowie im Ablationsmodus verwendet werden. Der Schneide- oder Ablationsmodus führt zu einer Verdampfung des Gewebes, da bei kontinuierlicher RFE und einer Leistung von 50 – 80 W sehr hohe Temperaturen (200 – 500 °C) entstehen. Hierfür benötigt man höheren Strom als für den Koagulationsmodus [73, 81, 92].

Beim Koagulationsmodus arbeitet man mit geringeren Temperaturen (bis etwa 70°C). Die Applikation gepulster Stromstöße bei einer Leistung von 30 - 50 W wird zur Denaturierung von Proteinen und zur Hämostase verwendet. Zudem gibt es kombinierte Schneide-/Koagulationsmodi [81].

Weiter lassen sich Geräte durch verschiedene Mechanismen zur Kontrolle der Energieabgabe voneinander unterscheiden. Um einen bestimmten Strom während der gesamten Behandlung zu gewährleisten, wird die elektrische Spannung kontinuierlich vom Gerät angepasst. Für das Aufrechterhalten einer bestimmten Temperatur während der Behandlung gibt es Geräte mit Thermosensoren an der Sonde. Die Zugabe des entsprechend nötigen Stroms wird über das Gerät reguliert. Eine weitere Möglichkeit bietet die Rückkopplung über die Messung des Widerstands im Gewebe. Kommt es durch Überhitzung zur Verdampfung von Gewebe, erhöht sich der Widerstand durch den Dampf so stark, dass sich das Gerät kurzfristig abschaltet [83]. Zudem findet man verschiedene Designs der Elektroden, welche von den Herstellern an unterschiedliche Anwendungen spezifisch angepasst sind [73].

### **2.3 Aktueller Stand der Forschung zur Chondroplastik durch bipolare RFE**

Obwohl die bipolare RFE häufig zur Knorpelglättung verwendet wird, gibt es nur wenige klinische Studien, welche bisher die Langzeitwirkung dieser Behandlung untersucht haben [39, 40, 93]. Vorhandene klinische Studien sind teils kontrovers und häufig aufgrund der kleinen Stichprobengröße zu wenig aussagekräftig [39, 40, 93–96]. Experimentelle Studien sind in größerer Zahl vorhanden, jedoch besteht auch hier kein Konsens über die unbedenkliche Anwendung bipolarer RFE [19, 20, 42, 46–51, 53, 54, 97].

Zunächst wird auf Studien eingegangen, welche die Wirkungen der RFE am Knorpel mit denen eines mechanischen Shavers verglichen haben.

Hinsichtlich der Glättung des Knorpels wurde von Turner et al. ein besseres Ergebnis nach bipolarer RFE-Behandlung im Vergleich zur Anwendung eines Shavers festgestellt [46]. In einem Schafmodell verglich man, gemessen an histologischen Kriterien, den Glättungseffekt durch die jeweiligen Behandlungen des Knorpels bei einer vorhandenen Chondromalazie. Die Apoptose der Knorpelzellen wurde dabei nicht untersucht.

Auch laut Edwards et al. scheint der Glättungseffekt durch RFE im Vergleich zum mechanischen Shaving deutlich besser zu sein [42, 51]. Nach einer artifiziell erzeugten Chondromalazie an der Gelenkfläche der Patella von Ponys wurde entweder ein mechanisches Debridement, eine mono- oder bipolare RFE-Anwendung durchgeführt. Sechs Monate nach Behandlung wurde den Ponys Knorpel entnommen und die Auswirkungen der verschiedenen Anwendungen untersucht. Beide RFE-Behandlungen führten zu einem deutlich höheren Anteil toter Knorpelzellen als die Behandlung mit mechanischem Shaver. Zwischen monopolarer und bipolarer Behandlung fand man diesbezüglich keinen Unterschied.

Die bipolare RFE hebt sich in dieser Studie von den restlichen Behandlungsweisen dadurch ab, dass sich die Permeabilität des kranken Knorpels durch die Behandlung verringerte und sich von der eines gesunden Knorpels nicht mehr unterschied [42]. Der dadurch verminderte Wasserverlust trägt zur Erhaltung der Stabilität des Knorpels bei und ist als positiver Effekt speziell der bipolaren RFE zu werten [18].

Allerdings kann nach 6 Monaten Beobachtungszeitraum der Langzeitverlauf nach einer RFE-Anwendung nicht beurteilt werden.

Lotto et al. zeigten in ihrer Studie mit menschlichen Knorpelproben, die arthrotische Veränderungen aufwiesen, hingegen, dass bei der Anwendung der RFE mehr Knorpelzellen als beim mechanischen Shaving überlebten und weniger gesunder Knorpel entfernt wurde [41]. Im Vergleich zum mechanischen Shaver führte die RFE zudem zu einer schnelleren Glättung des Knorpels.

In klinischen Studien findet man überwiegend bessere Ergebnisse nach einer bipolaren RFE-Behandlung im Vergleich zu Ergebnissen nach einem mechanischen Debridement. Owens et al. prüften die Wirksamkeit bipolarer RFE-Behandlung im Vergleich zum Debridement mit einem mechanischen Shaver bei Patienten mit Knorpeldefekten der Patella II. und III. Grades nach Outerbridge (vgl. Tab.1) [39]. Initial wurde der Schaden mittels Magnetresonanztomographie (MRT) beurteilt. Ziel war es, die Symptome durch die Behandlung zu lindern und das Fortschreiten des Knorpeldefektes zu verlangsamen. Im Follow-up wurde dies ein und zwei Jahre nach der Behandlung mittels des *Fulkerson-Shea Patellofemoral Joint Evaluation Scores* (darunter Angaben des Patienten zu Treppensteigen, Schwellung, Schmerz, Instabilität, Krepitation, Schlaffheit, Hilfsmittel) sowie einer klinischen Untersuchung gemessen. Der Score der Patienten nach bipolarer RFE-Behandlung der Patella war dem der Patienten nach Behandlung mittels mechanischem Debridement signifikant überlegen. Owens et al. ziehen als Ursache für die Unterschiede die feinere Behandlungsweise und den Versiegelungseffekt durch die bipolare RFE in Betracht [39].

In einer randomisierten prospektiven Studie von Spahn et al. wurden 60 Patienten mit einem Knorpeldefekt von Grad III an der medialen Femurkondyle entweder mit mechanischem Shaver oder mit temperaturregulierter (50 °C) bipolarer RFE (Paragon T2, ArthroCare) behandelt [40]. Präoperativ wurden die Patienten mittels des *Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Scores* (KOOS) und des *Tegner Activity Scores* befragt. Radiologisch wurden der mediale Kniegelenksspalt sowie Achsendeviationen im Kniegelenk gemessen. Dabei gab es präoperativ keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Vier Jahre postoperativ wurden die zwei Gruppen mithilfe beider Scores erneut befragt. Patienten waren nach

Behandlung mit bipolarer RFE deutlich zufriedener als jene mit einem mechanischen Debridement. Die radiologische Untersuchung zeigte im Vergleich bei der RFE-Gruppe eine weniger fortgeschrittene Gelenkspaltverschmälerung und Varusstellung [40].

Eine randomisierte Fallkontrollstudie untersuchte die Patienten nochmals im Verlauf von zehn Jahren [93]. Weder nach Auswertung des KOOSs und des *Tegner Activity Scores* noch bei radiologischer Untersuchung konnte ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden behandelten Gruppen 10 Jahre postoperativ festgestellt werden.

Ein weiterer positiver Aspekt der bipolaren RFE-Behandlung war, dass diese unmittelbar postoperativ weniger Schmerzen verursachte, wodurch die Patienten das Kniegelenk früher bewegen konnten. Auch die Blutung während der Operation fiel bei Anwendung der RFE geringer aus [93].

Die Anwendung bipolarer RFE wird aufgrund der Studien, die einen vermehrten Knorpelzelltod nachgewiesen haben, kontrovers diskutiert [42, 51]. Experimentelle Studien und Fallberichte liefern einen Hinweis auf die teils sehr hohe Temperaturbelastung des Knorpels und des umliegenden Gewebes und dadurch entstandene Schäden während der Behandlung [19, 20, 48–50, 53, 54, 86, 87, 89, 90, 98, 99].

In einem Fallbericht wird über Verbrennungen zweiten Grades an der Brustwand und Schulter nach Schulterarthroskopie mit RFE-Behandlung berichtet [99]. Wegen des fehlenden Verschlusses des Absauggeräts kam es in diesem Falle zum Entweichen der heißen Flüssigkeit aus dem Gelenk. Das Ausmaß der Verbrennungen verdeutlicht, wie gefährlich hoch die Temperatur der Flüssigkeit während einer Behandlung mit RFE ansteigen kann [99]. Neben der in dem Fallbericht geschilderten Schädigung umliegenden Gewebes kann sich zu starke Hitze auf die zu behandelnde Struktur selbst, den Knorpel, negativ auswirken [53, 86, 87, 89, 90].

Bereits ab einer Temperatureinwirkung von 45 °C konnte man Knorpelzellschäden feststellen [86, 87]. Zwischen den von Voss et al. als kritisch bezeichneten Temperaturen von 50 °C und 55 °C gehen Knorpelzellen durch den Einstrom von Calcium irreversibel zugrunde [53]. Arthrotischer Knorpel reagiert bei den hohen Temperaturen empfindlicher, was eine stärkere Abnahme der Proteoglykansynthese



zur Folge hat. Ab einer Einwirkung von 55 °C auf den Knorpel konnte man in einer Studie von Kaplan et al. keine Regeneration der Knorpelzellaktivität mehr feststellen [90]. Bei 65 °C betrifft dies nahezu 100 % der Knorpelzellen [89]. Dabei handelt es sich um den Temperaturbereich, welcher zur Umstrukturierung des Kollagens erforderlich ist [39]. Zu beachten ist, dass nicht nur die absolute Temperatur, sondern auch die Dauer der Temperatureinwirkung das Ausmaß des Untergangs der Knorpelzellen beeinflusst [88]. Shellock fand bei der Anwendung sowohl bipolarer als auch monopolarer RFE bis zu einem Millimeter unter der Knorpeloberfläche einen Anstieg der Temperaturen über die kritische Temperatur von 55 °C [53, 90, 100]. Gemessen wurden die Temperaturen in verschiedenen Tiefen und zu unterschiedlichen Behandlungsdauern. Festzustellen war ein Anstieg der Temperatur abhängig von der Dauer der Behandlung mit den höchsten Temperaturen (10 s bipolare Behandlung: 94.7 °C, 5 s monopolare Behandlung: 93.8 °C) an der Knorpeloberfläche [100].

Sowohl der Glättungseffekt als positives Ergebnis als auch der Untergang der Knorpelzellen als negativer Nebeneffekt wurden in vielen experimentellen Studien untersucht. Besonders wird hier auf Studien zur bipolaren RFE eingegangen. Der Vollständigkeit halber werden auch relevante Erkenntnisse aus der Anwendung monopolarer RFE ergänzt.

Kaplan et al. untersuchten menschlichen Knorpel in vitro hinsichtlich der Glättung des Knorpels sowie des Zustandes der Knorpelzellen nach bipolarer RFE-Behandlung [20]. Der von Patienten bei einer Arthroplastik entnommene arthrotische Knorpel wurde mit einem ArthroCare Gerät (bipolar) behandelt. Nach Anwendung verschiedener Leistungseinstellungen gab es keinen Unterschied zwischen den Ergebnissen. Mikroskopisch war eine Glättung des erkrankten Knorpels als konkave Aushöhlung sichtbar. Die Knorpelzellen selbst wiesen weder zytoplasmatische noch nukleäre Veränderungen auf. Auch die Lakunenstruktur erschien nach Behandlung unverändert [20].

Bei Anwendung bipolarer RFE (ArthroCare) in vitro an menschlichem von Chondromalazie betroffenen Knorpel evaluierten Lu et al. die Absterberate der Knorpelzellen [50]. Wo lichtmikroskopische Bilder keinen Hinweis auf Zellschaden lieferten, sah man mit einem konfokalen Lasermikroskop einen deutlichen Untergang

von Knorpelzellen. So kann man auch in der vorangegangenen Studie von Kaplan et al., welche den Zustand der Zellen lediglich mit lichtmikroskopischen Bildern beurteilten, vermehrten Zellschaden nicht ausschließen [20, 50].

Lu et al. verglichen erstmals verschiedene Geräte und Behandlungsmuster auf deren Wirkung am Knorpel [19]. In einer experimentellen Studie wurden sowohl monopolare (Oratec) als auch bipolare Geräte (ArthroCare und Mitek) an Rinderknorpel getestet. Bipolare RFE verursachte den Tod von Knorpelzellen in um 78 – 92 % tiefer liegenden Schichten als monopolare RFE, wobei ein Absterben der Knorpelzellen nach allen Behandlungen auftrat. Im Gegensatz zur Behandlung mit bipolarer RFE waren Knorpelzellen unmittelbar oberhalb des subchondralen Knochens nach Behandlung mit dem monopolaren Gerät nie vom Zelluntergang betroffen. Ein Glättungseffekt war mit bipolaren Geräten schneller und besser zu erreichen. Beurteilt wurde die Glättung mit einem Rasterelektronenmikroskop und der Zelltod mit Hilfe eines konfokalen Lasermikroskops [19].

Wichtig hierzu ist eine weitere Studie von Lu et al. über monopolare RFE, in der nicht nur der Zelltod unmittelbar nach der Behandlung gemessen wurde, sondern die Zellen auch im weiteren Verlauf beobachtet wurden [49]. Vierzehn Tage nach der Behandlung konnte man eine noch höhere Anzahl an abgestorbenen Zellen messen, was auf eine induzierte Apoptose hindeutet. Nach sechs Monaten konnte man keine Rehabilitation der Zellen feststellen. Der Schaden scheint irreversibel zu sein [49].

In einigen Studien wurden die hohen Temperaturen in Knorpel und Umgebung während der Behandlung und der damit einhergehende Knorpelzelluntergang untersucht.

Edwards et al. erfassten deutlich höhere Temperaturen während bipolarer Behandlung im Vergleich zur monopolaren [54]. Während der Behandlung des Rinderknorpels mit bipolarer RFE nahm das Gewebe in 200 - 500 µm unter der Oberfläche Temperaturen zwischen 95 °C und 100 °C an. Selbst in 2000 µm Tiefe wurden 75 - 78 °C gemessen, unabhängig von der Spülung der Oberfläche mit Spülflüssigkeit [54]. Diese Temperaturen liegen über der für Knorpelzellen schädlichen Temperatur von 50 – 55 °C [53].

Der Knorpelzelltod konnte nach bipolarer Behandlung mittels einer Live/Dead-Färbung bis in die Tiefe von 2810 µm festgestellt werden [47]. Eine Live/Dead-

Färbung ermöglicht eine mikroskopische Unterscheidung lebender Zellen von toten Zellen. Lebende Zellen werden durch einen grün fluoreszierenden Komplex im Cytoplasma markiert. Tote Zellen werden über rote Fluoreszenzen eines zugeführten Farbstoffs an deren DNA sichtbar gemacht.

In einer weiteren experimentellen Studie von Lu et al. wurden menschliche Knorpelimplantate mit mono- oder bipolarer RFE behandelt [48]. Sowohl der Glättungseffekt als auch die Häufigkeit des Knorpelzelluntergangs wurden für verschiedene Behandlungszeiten evaluiert. Nach einer Behandlungsdauer von fünf Sekunden zeigte die Anwendung monopolarer RFE bereits einen deutlichen Glättungseffekt im Vergleich zur bipolaren RFE. Ab einer Behandlungsdauer von fünfzehn Sekunden unterschieden sich die Glättungseffekte nicht mehr. Die bipolare RFE-Behandlung führte zu einem vermehrten Absterben der Knorpelzellen bis auf den subchondralen Knochen. Da eine längere Behandlungsdauer jedoch einen besseren Glättungseffekt verspricht, wird von Lu et al. empfohlen, bipolare RFE mit höchster Vorsicht anzuwenden. Die Ursache für den späteren Eintritt des Glättungseffektes sehen die Autoren darin, dass die bipolare Elektrode während der Behandlung keinen direkten Kontakt mit dem Knorpel hat, sodass erst die Spülflüssigkeit erhitzt werden muss, bis die Wirkung am Knorpel selbst eintreten kann [48].

Bei der Anwendung zweier bipolarer Geräte an Rinderknorpel in vitro, fanden Amiel et al. lediglich bis in eine Tiefe von 200 µm tote Knorpelzellen [101]. Die Schichten unmittelbar über dem subchondralen Knochen blieben immer unversehrt.

In Anbetracht der hohen gemessenen Temperaturen und dem dadurch bedingten großen Ausmaß des Knorpelschadens ist die Kontrolle der am Knorpel entstehenden Temperatur wichtig. Neben der Wirkung des RFE-Geräts selbst ist der Einfluss der eingesetzten Spülflüssigkeit nicht zu unterschätzen. Sowohl für die Beurteilung bisheriger experimenteller Ergebnisse als auch für die klinische Anwendung von RFE am Patienten sind Untersuchungen dazu sehr wertvoll.

Lu et al. stellten bei Experimenten mit monopolarer RFE an von Patienten entnommenen Proben fest, dass ein geringerer Anteil an toten Knorpelzellen bei Behandlung mit einer Spülflüssigkeit von 37 °C im Vergleich zu einer von 22 °C

auftrat [97]. Erklärt wird dies durch die geringere Energieabgabe des RFE-Geräts, welche nötig ist, um die für die Behandlung wirksame Temperatur zu erreichen.

Weiter wird neben der Kontrolle der Temperatur der Spülflüssigkeit auch auf die Wichtigkeit der ständigen Spülung des Gelenks während der Behandlung hingewiesen.

Nur durch einen adäquaten Fluss der Spülflüssigkeit können laut Sotereanos et al. Höchsttemperaturen von über 60 °C vermieden werden [102]. Dies wurde in einem Experiment bei der Anwendung von RFE an Handgelenkskadavern herausgefunden. Diese Erkenntnis wurde durch eine Studie über die RFE-Behandlung des Hüftgelenkknorpels mit bipolarer Elektrode von McCormick et al. erhärtet [103]. Die Umgebungstemperatur im Umkreis von 5 mm von der Sonde überstieg eine Temperatur von 50 °C erst, wenn ein Wechsel der Spülflüssigkeit im Abstand von mindestens fünfzehn Sekunden stattfand.

In einer Studie von Zoric et al. wurde die Behandlung mit einem bipolaren Gerät der Firma ArthroCare, welche die Studie auch finanziell unterstützte, an menschlichen Schulterpräparaten getestet [104]. Es fanden Temperaturmessungen in verschiedenen Abständen zur Elektrodenspitze statt, während sowohl die Einstellungen am Gerät als auch der Einsatz der Spülflüssigkeit variiert wurden. Die Ergebnisse blieben von den verschiedenen Geräteeinstellungen unbeeinflusst. Die Spülflüssigkeit beeinflusste die gemessene Temperatur jedoch enorm. Ohne Fluss der Spülflüssigkeit wurde die kritische Temperatur von 50 °C in 32 % der Fälle überschritten, mit Fluss lediglich bei 1 %. Die Höchsttemperatur von 80 °C wurde nach zweiminütiger Behandlung ohne Spülung gemessen. Je weiter entfernt von der Sonde die Temperatur gemessen wurde, je höher die Flussrate der Spülflüssigkeit und je kürzer die Behandlungsdauer, desto niedriger war die gemessene Temperatur. Dieses Experiment fand bei Raumtemperatur statt.

Huber et al. betrachteten in einer experimentellen Studie an Handgelenkskadavern die Temperaturentwicklung bei Anwendung monopolarer und bipolarer RFE [89]. Da der Gelenkraum viel kleiner ist und auch der Knorpel dünner als beim häufig untersuchten Kniegelenk, spielt der Temperaturanstieg bezüglich der negativen Auswirkungen eine große Rolle. Bei bipolarer Behandlung konnte man die Temperaturen nicht unter den für Knorpelzellen schädlichen Wert von 50 °C

senken [53]. Je länger die Behandlung andauerte, desto höher stiegen die Temperaturen. Die Anwendung von Spülflüssigkeit begünstigte eine Reduktion der Temperatur. Als Ursache für die dennoch zu hohen Temperaturen wird die mangelnde Kontrolle über den Fluss der Spülflüssigkeit bei der Handarthroskopie gesehen, sodass bei einer Verbesserung des Flusses ein Schaden möglicherweise verhindert werden kann [89]. Bei der Chondroplastik der Fossa Lunata mit bipolarer RFE wurde eine mittlere Temperatur von 30 °C in der Umgebung nicht überschritten [23]. Auch lokal im subchondralen Knochen nahmen Durchschnittswerte maximal 40.16 °C an. Jedoch konnte man mehrmals Temperaturhöchstwerte von über 50 °C bereits ab einer Behandlungsdauer von fünfzehn Sekunden messen. Der Tod von Knorpelzellen kann somit nicht ausgeschlossen werden [23]. Im Vergleich von monopolarer und bipolarer RFE konnte man bei bipolarer RFE einen früheren und höheren Temperaturanstieg messen [52].

Weiter fand man heraus, dass die hohe Temperatur während der Behandlung, welche für den Zelluntergang verantwortlich gemacht wird, sehr schnell wieder abfällt, nachdem der Stromfluss unterbrochen wird. Ein Überschießen der Temperatur und die damit einhergehende Apoptose gesunder Knorpelzellen kann möglicherweise durch eine gepulste Behandlung mit intermittierenden Pausen verhindert werden [23].

Auch die Zusammensetzung der Flüssigkeit habe laut Gulihar einen Einfluss auf die Knorpelzellaktivität [105]. Bei der am häufigsten bei RFE-Behandlungen verwendeten Kochsalzlösung wird die Proteoglykansynthese am stärksten inhibiert. Dahingegen wies die Ringerlösung die geringste Inhibierung auf.

Darüber hinaus sollten mögliche Unterschiede zwischen den Geräten verschiedener Firmen bei der Beurteilung der Studien beachtet werden.

In einer Studie von Ganguly et al. wurden eine nicht ablativ Technik mit ablativen Techniken unterschiedlicher Firmen, sowohl mono- als auch bipolar, verglichen [106]. Fibrillierter Knorpel wurde durch jede der Behandlungsweisen entfernt. Mono- und bipolare RFE-Geräte mit Ablation verursachten bei gleicher Behandlungsdauer Nekrosen in der Umgebung sowie eine Beschädigung der Tangentialfaserschicht und der Transitionalzone des Knorpelgewebes. Dahingegen bewirkte das nicht

ablative Gerät bei der Glättung des Knorpels eine Instandhaltung der Tangentialfaserschicht. Auch Nekrosen und Apoptosen wurden verhindert.

In einer experimentellen Studie von Huang et al. wurden verschiedene Einflussfaktoren der RFE-Behandlung auf den Knorpelzelluntergang miteinander verglichen [107]. Zwei verschiedene Geräte, verschiedene Leistungsstufen, sowie unterschiedliche Behandlungsdauer und eine Variation an Spülflüssigkeitstemperaturen wurden bei bipolarer RFE-Behandlung in vitro an menschlichem Knorpel untersucht. Im Vergleich zum ArthroCare TriStar 50 Gerät erzeugte die Paragon T2 Gruppe niedrigere Absterberaten. Bestätigt wird auch hier, dass weniger Knorpelzellen durch die Behandlung sterben, je näher die Temperatur der Spülflüssigkeit an der Körpertemperatur ist. Eine Verkürzung der Behandlungsdauer bewirkte einen geringeren Anteil an toten Knorpelzellen.

Jedoch schien hier, im Gegensatz zu den vorangegangenen Studien [20], auch die Leistungseinstellung Einfluss auf die Knorpelzellen gehabt zu haben. So ist nach Huang et al. eine niedrige Leistung bei der Anwendung von RFE zu empfehlen [107]. Auch Ryan et al. testeten verschiedene Leistungseinstellungen auf deren Auswirkung auf den Knorpel [108]. Mit zunehmender Leistung kam es zu einem häufigeren Absterben von Knorpelzellen, weshalb die Autoren eine Anwendung von RFE mit 20 W empfehlen.

Neben dem Schaden an den Knorpelzellen selbst, ist die Beschädigung des subchondralen Knochens durch Anwendung von bipolarer RFE Thema einiger Studien.

Die Temperatur, welche bei Osteoblasten eine Apoptose induzieren kann, liegt bei 48 – 52 °C [109]. Diese Werte wurden in genannten experimentellen Studien bei subchondraler Temperaturmessung während RFE-Behandlungen bereits überschritten [47, 48, 54].

In einer klinischen Studie wurden Patienten mit Osteoarthrose II. und III. Grades nach Outerbridge (vgl. Tab.1) am Kniegelenk mit bipolarer RFE behandelt und nach sechs Monaten auf das Vorhandensein einer Osteonekrose untersucht [110]. Bei vier Prozent konnte eine Osteonekrose festgestellt werden.

Bonutti et al. berichten von einem klinisch positiven Outcome bei einer Arthroplastik am Kniegelenk mittels RFE [22]. Gleichzeitig warnen sie davor, Anzeichen einer

Osteonekrose wie Knieschmerzen und eine eingeschränkte Gelenkfunktion nach vorangegangener arthroskopischer RFE-Behandlung zu übersehen.

Im Gegensatz zu den Bedenken bezüglich der RFE-Behandlung von Seiten experimenteller Studien, wird klinisch überwiegend von positiven Ergebnissen nach Anwendung bipolarer RFE berichtet. Langzeitstudien fehlen.

Während der arthroskopischen Behandlung mit bipolarer RFE am Kniegelenk wurde in einer Fallserie der Grad des Knorpelschadens, sowie Lokalisation und Größe dokumentiert [94]. In einer zweiten Arthroskopie, 0.7 bis 32.7 Monate später, wurde der Zustand des Knorpels erneut untersucht. Bei 12 % der Patienten kam es zu einer Progression des Knorpelschadens, bei mehr als 50 % hingegen fand eine Füllung des Defekts mit Narbengewebe, ähnlich dem Faserknorpel, statt. Tibiofemorale Läsionen zeigten eine bessere Reaktion auf die RFE als femoropatellare Läsionen. Ein Langzeiteffekt wurde nicht untersucht.

In einer retrospektiven Studie von Gharaibeh et al. wurden 840 arthroskopische Knieoperationen mit bipolarer RFE-Behandlung drei Monate postoperativ evaluiert [95]. Die Patienten wurden mittels KOOS und WOMAC (*Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index*) befragt. WOMAC bewertet das Outcome einer Behandlung über drei Skalen (Schmerz, Steifheit und Funktion). Bei beiden Bewertungssystemen zeigte sich eine deutliche Verbesserung von dem präoperativem zu dem postoperativem Status [95]. Auch wenn diese Studie keine Kontrollgruppe beinhaltet, macht die große Fallzahl doch deutlich, dass das Empfinden des Patienten und die Funktionalität des Gelenkes durch die Anwendung der bipolaren RFE verbessert werden konnten.

In einer systematischen Übersichtsarbeit von zehn klinischen Studien, kamen Papalia et al. zu dem Konsens, dass die Anwendung von Radiofrequenzenergie klinisch gesehen positiv zu bewerten ist [111]. Sie bemängeln jedoch die kleinen Kohortengrößen und fordern darüber hinaus mehr Langzeitstudien. Endgültig ist daher noch keine Aussage zu treffen.

Hogan und Diduch fordern mehr prospektive Studien mit einer *Second-Look*-Arthroskopie [96]. Entgegen der vielen positiven Berichte, berichten sie über einen Fall, bei dem es nach bipolarer RFE-Behandlung zu einer Progression der Läsion am Knorpel mit einer Abnahme der Knorpeldicke kam.

Es ist somit bewiesen, dass durch die Anwendung bipolarer RFE hohe Temperaturen entstehen, die zu einem Untergang und irreversiblen Schaden an Knorpelzellen führen. Gleichzeitig ist ein Glättungseffekt nach bipolarer RFE-Behandlung elektronenmikroskopisch an der Knorpeloberfläche gut sichtbar. Laut klinischen Studien führt die bipolare RFE-Behandlung überwiegend zu positiven Ergebnissen.

Trotz fehlender gesicherter Studien zum korrekten Einsatz der Radiofrequenzenergie wird diese in der Arthroskopie vielfach angewendet. Langzeiteffekte sind noch nicht ausreichend untersucht.

Derzeit findet man noch keine Studie, welche verschiedene Behandlungsmuster bipolarer RFE miteinander vergleicht und dabei gleichzeitig sowohl den Glättungseffekt als gewünschte Wirkung, als auch den Untergang der Knorpelzellen als negativen Nebeneffekt untersucht.



### **3. Fragestellungen und Zielsetzung der Studie**

Ziel dieser Studie ist es, sechs verschiedene Behandlungsmuster sowohl auf den gewünschten Glättungseffekt als auch auf den Knorpelzelluntergang als negativen Effekt nach Behandlung eines Schweineknorpels mit bipolarer Radiofrequenzenergie zu untersuchen. An den Schweineknorpelpräparaten eines Tibiaplateaus wurde die Rauheit einer Osteoarthrose III. Grades in einem vorgeschalteten Versuch mit Sandpapier (P60) imitiert. Die Knorpeldicke ähnelt dabei der des menschlichen Handgelenkknorpels. Basierend auf der Evidenz der oben angeführten Studien wurden in dieser Studie bipolare RFE-Behandlungen mit gepulstem sowie kontinuierlichem Stromfluss durchgeführt. Die Behandlungen wurden einfach sowie zweifach angewendet.

Folgende Fragen wurden in dieser Studie explorativ untersucht:

#### **Gewünschter Glättungseffekt nach RFE-Behandlung**

- Unterscheidet sich die einmalig behandelte Fläche bereits signifikant bezüglich des Rauheitswertes von der unbehandelten Fläche?
- Ist der Knorpel nach Wiederholung der Behandlung deutlich glatter als nach einfacher Behandlung?
- Gibt es einen Unterschied im Glättungseffekt zwischen den verschiedenen Behandlungsmustern?

### **Knorpelzelluntergang als Nebeneffekt der RFE-Behandlung**

- Wie hoch ist der Anteil toter Knorpelzellen an allen im Gewebe enthaltenen Knorpelzellen nach einmaliger Durchführung der Behandlung?
- Gibt es eine Veränderung im Anteil toter Knorpelzellen von einmaliger Behandlung zu zweimaliger Behandlung?
- Gibt es einen quantitativen Unterschied bezüglich der Verursachung von Knorpelzelluntergang zwischen den verschiedenen Behandlungsmustern?

In einer Zusammenschau wird eruiert, wie zügig der gewünschte Glättungseffekt eintritt und wie rasch und ausgeprägt es zum unerwünschten Knorpelzelluntergang kommt. Um die verschiedenen Behandlungstechniken miteinander zu vergleichen, wurden diese jeweils auf deren Effekte untersucht und einander gegenübergestellt.

## **4. Materialien und Methoden**

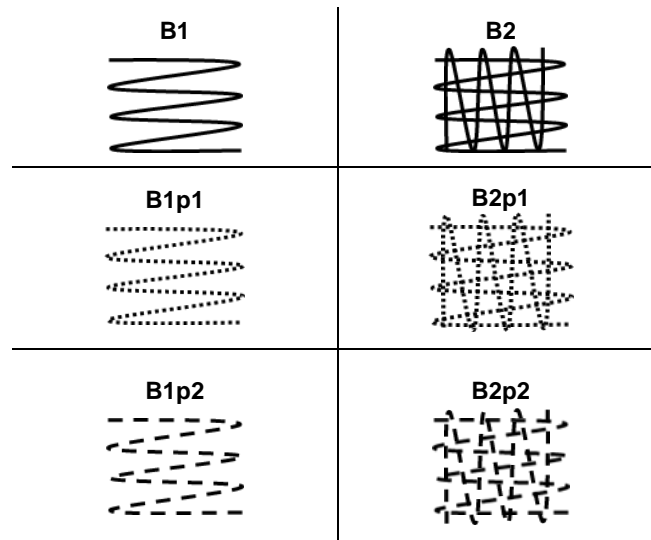
### **4.1 Herstellen der Proben: Vorbereitung und Behandlung des Schweineknorpels**

Für die Behandlung mit einer bipolaren Radiofrequenzenergiesonde wurden 36 Areale in einer Größe von einem Quadratzentimeter auf dem Tibiaplateau frisch geschlachteter Schweine markiert (pro Tibiaplateau 4 Areale). Die Dicke des gewählten Knorpels ähnelt der Knorpeldicke des menschlichen Handgelenkknorpels. Nach Imitierung der Rauheit von Osteoarthritis III. Grades durch Schleifung der Knorpeloberfläche mit Sandpapier (P60) wurden die markierten Flächen der Tibiaplateaus mit einer bipolaren Radiofrequenzenergiesonde meanderförmig in sechs verschiedenen Methoden behandelt:

- Kontinuierlich einmal (B1)
  - Kontinuierlich zweimal (B2)
  - Gepulst einmal mit einem Behandlungsintervall von einer Sekunde (1s) (B1p1)
  - Gepulst zweimal mit einem Behandlungsintervall von einer Sekunde (B2p1)
  - Gepulst einmal mit einem Behandlungsintervall von zwei Sekunden (B1p2)
  - Gepulst zweimal mit einem Behandlungsintervall von zwei Sekunden (B2p2)
- (vgl. Abb. 3)

Kontinuierlich bedeutet hierbei, dass sowohl der Stromfluss als auch die Bewegung der Sonde über die Knorpeloberfläche ohne Unterbrechung verliefen.

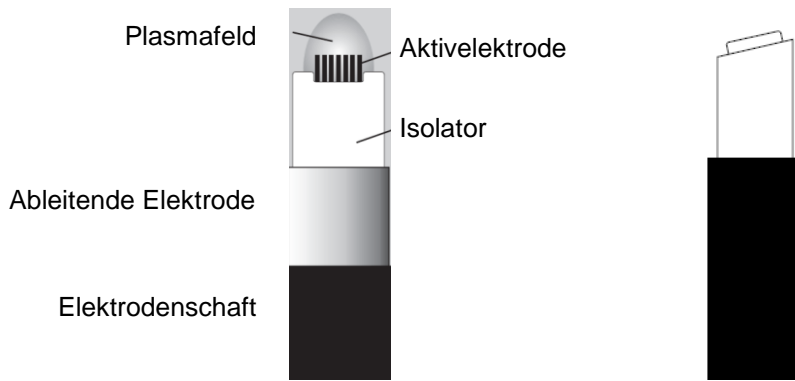
Bei gepulster Behandlung wurden die Flächen mit einem Stromfluss von einer Sekunde (p1) oder zwei Sekunden Dauer (p2) behandelt, woraufhin jeweils eine Pause von zwei Sekunden folgte, bei der sowohl der Stromfluss als auch die Bewegung der Sonde über die Knorpeloberfläche angehalten wurden.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Behandlungsmuster: B1: Einmalige kontinuierliche bipolare RFE-Behandlung, B2: Zweimalige kontinuierliche bipolare RFE-Behandlung, B1p1: Einmalige gepulste bipolare RFE-Behandlung mit einem Behandlungsintervall von 1 s, B2p1: Zweimalige gepulste bipolare RFE-Behandlung mit einem Behandlungsintervall von 1 s, B1p2: Einmalige gepulste bipolare RFE-Behandlung mit einem Behandlungsintervall von 2 s, B2p2: Zweimalige gepulste bipolare RFE-Behandlung mit einem Behandlungsintervall von 2 s**

Die Dauer von B1 eines Areals betrug etwa 18 s, B1p1 und B1p2 etwa 1 min. Mit Wiederholung des Behandlungsmusters benötigten B2 etwa 30 s, B2p1 etwa 01:30 min und B2p2 etwa 01:39 min.

Die bipolare Sonde wurde freihändig mit einem Abstand von 1 mm zur Knorpeloberfläche geführt. Zur bipolaren Behandlung wurde das Gerät DePuy Mitek VAPR® II (DePuy Mitek, Inc., MA, USA) mit einer 2.3 mm Flügelelektrode im Koagulationsmodus in der vom Hersteller empfohlenen Einstellung verwendet (vgl. Abb. 4).



**Abbildung 4:** links: Aufbau der Sondenspitze des VAPR® II Gerätes, rechts: die im Versuch verwendete 2.3 mm Flügelelektrode, laut Hersteller Minimierung von Kollateralschäden durch den Isolator sowie die Neigung von 45°

Das Tibiaplateau befand sich während der gesamten Behandlung in NaCl-Lösung (0,15 mol/L) bei Raumtemperatur mit einer Spülrate von 50 ml/min. Die behandelten Areale wurden mit einer oszillierenden Säge (Bühler Säge) bis zu 1 cm dick von dem Knochen geschnitten. Für die Live/Dead- und Caspase-Färbungen wurden insgesamt pro Probe vier histologische Schnitte mit einer Dicke von 1 mm sowie noch einzelne für Kontrollmessungen entnommen. Die Fixierung und Färbung der Schnitte geschah unmittelbar im Anschluss an den jeweiligen Versuch.

#### 4.1.1 Live/Dead-Färbung

Pro Probe wurde jeweils ein Schnitt für die Live/Dead-Färbung verwendet. Die Präparate wurden zuerst in Ethidiumbromidhomodimer mit Calcein-Acetoxymethylester (AM) in RPMI ohne Serum für dreißig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung abgenommen, die Proben wurden mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und für die Dauer von einer Stunde fixiert.

Zur Kontrolle der sicheren Detektion toter Knorpelzellen durch die Färbung wurden einzelne Präparate dreimal im Wechsel eingefroren und aufgetaut, bevor sie nach einer Wartezeit von dreißig Minuten gefärbt und fixiert wurden.

Bildaufnahmen der Schnitte wurden unter einem konfokalen Mikroskop (Nikon Eclipse E600, Kawasaki, Japan) gemacht.

Calcein-AM wird aktiv durch die Zellmembran lebender Zellen ins Cytoplasma transportiert, wo es dann in Calcein umgewandelt wird. Durch die Chelatisierung von Calcium wird ein grün fluoreszierender Komplex gebildet. Bei toten Zellen gelangt Ethidiumbromidhomodimer durch die Porenöffnung der Zellmembran an deren DNA, wodurch der Farbstoff rot fluoresziert.

#### **4.1.2 Caspase-Färbung**

Für unseren Versuch wurden von jedem behandelten Areal jeweils 3 Schnitte angefertigt, um den Verlauf der Apoptose nach Behandlung beobachten zu können. Die Aggregate wurden mit einer 1:500 Arbeitsverdünnung von einem 1:250 CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Fa. Invitrogen, ThermoFisher, Dreieich, Deutschland) in DMEM mit niedrigem Glukosegehalt (Fa. Gibco, ThermoFisher) und 10 % *Fetal Calf Serum* (PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) für jeweils 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Nach dem Abnehmen der Lösung wurden die Proben einmal mit PBS gespült und anschließend für eine Stunde fixiert. In der Enzymkaskade des programmierten Zelltods, der Apoptose, sind Caspasen ein essentieller Bestandteil. In dem im Versuch verwendeten CellEvent® Caspase-3/7 Green Detection Reagent (Fa. Invitrogen, ThermoFisher, Dreieich, Deutschland) ist ein nukleinsäurebindender Farbstoff mit einem Emmissionsmaximum von etwa 530 nm über eine Spaltstelle an ein Peptid (DEVD) konjugiert [112]. Bei Apoptose der Zellen spaltet die aktivierte Caspase-3/7 die DEVD-Peptidsequenz von dem Farbstoff, wodurch dieser im Zellkern an die DNA binden kann und dort eine fluorogene Reaktion produziert. Diese lässt den Zellkern in Aufnahmen mit einem Fluoreszenzmikroskop grün erscheinen.

#### 4.1.3 Silbernitratimprägnierung

Zur späteren Messung der Oberflächenrauheit des Knorpels mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (CLSM) (Olympus LEXT OLS4000 3D *Laser-Measuring-Microscope*, Olympus, Hamburg, Deutschland) wurden die Proben mit Silbernitrat ( $\text{AgNO}_3$ ) gefärbt. Die Gewebeexplantate wurden über Nacht in einer 4 % Formaldehyd Lösung in 0.1 M Phosphatpuffer, 15 % Pikrinsäurelösung und 0.1 % Triton X-100 enthaltend, fixiert. Die Proben wurden dreimal mit Puffer gewaschen und über Nacht in 2 % Tanninsäure in  $\text{H}_2\text{O}$  inkubiert. Danach wurden die Explantate des Tibiaplateaus sechs Stunden lang mit wechselndem Wasser gewaschen und anschließend über Nacht mit 4 %  $\text{AgNO}_3$  in  $\text{H}_2\text{O}$  imprägniert. Die gefärbten Proben wurden gewaschen, mehrfach mit jeweils steigenden Konzentrationen an Aceton dehydriert. Aceton wurde sodann mit 100 % tert-Butanol ersetzt. In kleinen Aluminiumschalen wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und vakuumgetrocknet. Die dadurch entstandene tiefschwarze Farbe der Knorpeloberfläche erleichtert die anschließende Messung der Oberflächenrauheit mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop.

## 4.2 Versuchsdurchführung

### 4.2.1 Messung der Oberflächenrauheit des Knorpels

Die Oberflächenrauheit der Knorpeloberfläche wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) (Olympus LEXT OLS4000 3D *Laser-Measuring-Microscope*, Olympus, Hamburg, Deutschland) gemessen. Dieses wurde vom *Regensburg Center of Biomedical Engineering* (RCBE) der Fakultät Maschinenbau der OTH Regensburg zur Verfügung gestellt.

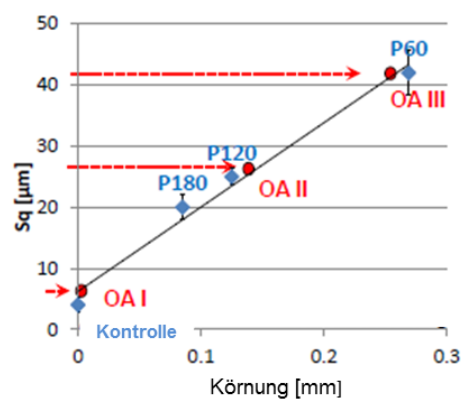
Es handelt sich hierbei um ein Mikroskop, das mit Hilfe eines Lasers die Oberfläche eines Objektes detektiert. Es wird sowohl ein zweidimensionales als auch ein dreidimensionales Bild der Oberfläche erstellt [113]. Durch eine Färbung der Präparate mit Silbernitrat erreicht das Mikroskop bei der dadurch entstehenden Reflexion besonders präzise Messungen.

Zur Messung der Oberflächenrauheit wird der Parameter Sq in Mikrometer kalkuliert, entsprechend dem *Root-Mean-Square* (RMS). Ein Höhenunterschied von bis zu 0.05 µm wird mit einer Genauigkeit von 90 % detektiert [113].

Der Versuchsaufbau stützt sich auf Vorversuche des RCBE, welche in Zusammenarbeit mit der Klinik für Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Regensburg in einem Poster unter dem Titel *Quantitative analysis of cartilage surface by confocal laser scanning microscopy* (Dr. Striegl, PD Dr. Huber, Dr. Kujat, Prof. Dendorfer) veröffentlicht wurden [114]. Es wurde die Oberflächenrauheit von menschlichen Knorpelproben des Femurkopfes verschiedener Osteoarthrosegrade mit dem Parameter Sq gemessen. Verglichen wurden diese Werte mit der gemessenen Oberflächenrauheit von Schweineknorpel des Tibiaplateaus, der mit Schleifpapier verschiedener Körnungen (P180, P120, P60) behandelt wurde. Alle Proben wurden fixiert, gefärbt und gefriergetrocknet.

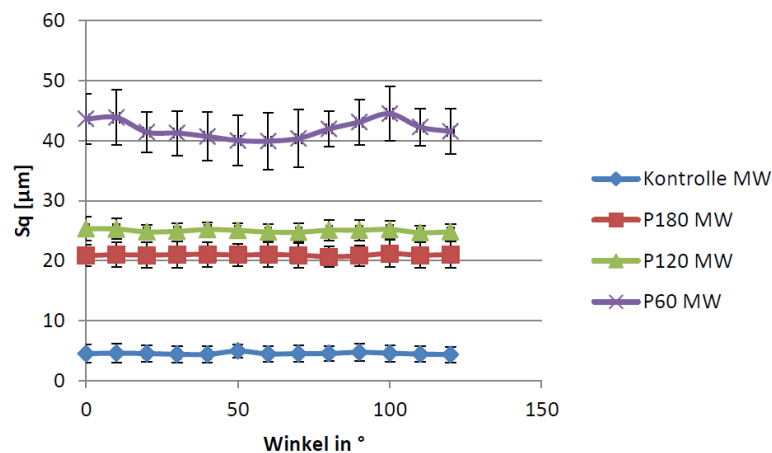


Bei der Messung fiel eine Korrelation zwischen der Oberflächenrauheit des mit Schleifpapier behandelten Knorpels und des Osteoarthrosegrades an den entnommenen Proben des Femurkopfes auf. Die gemessenen Rauheitswerte der Osteoarthrose Grad II nach Outerbridge entsprachen denen der Präparate, die mit einer Körnung von P180 - P120 behandelt wurden, und die Rauheitswerte der Osteoarthrose Grad III denen der Präparate, die mit einer Körnung von P120 - P60 behandelt wurden (vgl. Abb. 5).



**Abbildung 5:** Korrelation der gemessenen Sq-Werte verschiedener Osteoarthrosegrade (OA I, OA II, OA III) mit der Rauheit von einer unbehandelten Kontrolle sowie mit Sandpapier verschiedener Körnungen behandeltem Schweineknorpel (P180, P120, P60) anhand von Einzelbeispielen (Dr. Striegl, PD Dr. Huber, Dr. Kujat, Prof. Dendorfer)

Je höher die Rauheit und somit die gemessenen Sq-Werte, desto größer schwankten diese um einen Mittelwert bei der Messung aus verschiedenen Winkeln (vgl. Abb. 6). Dies hängt von der Schleifrichtung und der Scanrichtung des Lasers ab, da bei Überlappung beider Richtungen geringere Werte gemessen werden als bei einer senkrechten Ausrichtung der Scanrichtung Lasers zur Schleifrichtung. Dementsprechend wichtig ist es, die gewünschte Stelle bei großer Rauheit von unterschiedlichen Winkeln aus zu messen.



**Abbildung 6: Schwankung der Sq-Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung in Abhängigkeit von der Rauheit des Knorpels nach Behandlung mit Schleifpapier verschiedener Körnungen (P60, P120, P180) und deren Messung aus verschiedenen Winkeln (Dr. Striegl, PD Dr. Huber, Dr. Kujat, Prof. Dendorfer)**

Durch die genannten Versuche wurde eine Methode etabliert, bei der man die Osteoarthrose durch Messung der Oberflächenrauheit des Knorpels mittels eines CLSM gradieren kann.

In unserer Studie wurden vor der Messung mit dem CLSM pro Präparat mit Hilfe einer Akupunkturnadel (0.30 x 30 mm) im Durchschnitt sechs quadratische Areale mit einer Größe von vier Quadratmillimetern im behandelten Bereich markiert, sowie jeweils ein Areal im unbehandelten Bereich (Referenzwert) (vgl. Abb. 7). Zudem wurden unbehandelte native Flächen vermessen.



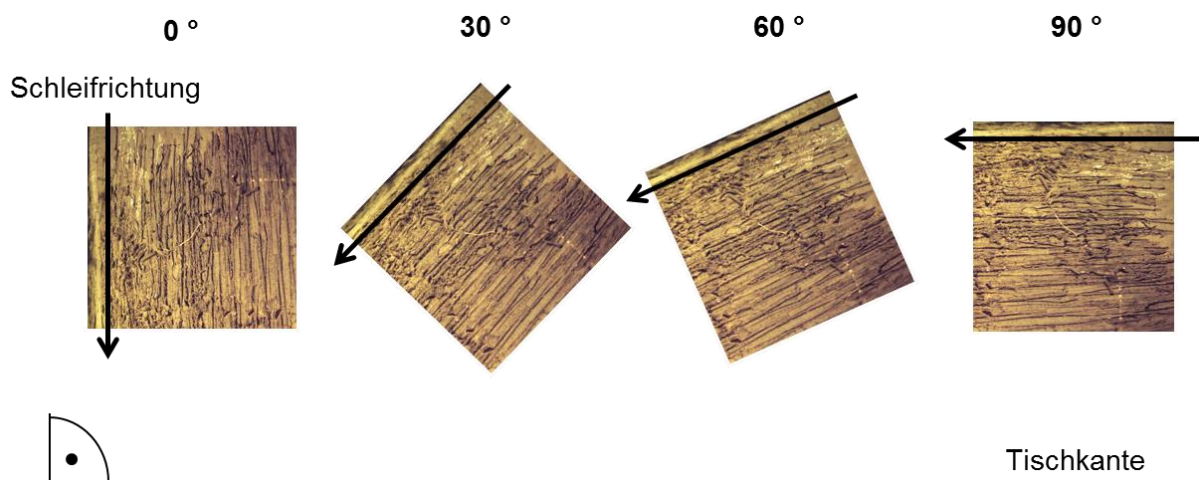
**Abbildung 7:** lichtmikroskopische Aufnahme (x 0.7) einer Knorpelprobe, unten: sechs markierte Flächen im behandelten Bereich des Knorpels, oben: eine markierte Fläche außerhalb des behandelten Bereiches

Bei einem Teil der Präparate konnte aufgrund von Artefakten oder einer zu kleinen Gesamtfläche nur eine geringere Anzahl an Flächen markiert werden. Insgesamt wurden 178 Flächen verteilt auf 36 Blöcken vermessen.

Zur Messung wurde das Präparat jeweils mit einer Ausrichtung der Schleifrichtung von neunzig Grad zur Tischkante auf einem Objektträger mit Knetmasse fixiert und die markierte Fläche bei 108facher Vergrößerung mit einem Ausschnitt von 1281  $\mu\text{m}$  x 1279  $\mu\text{m}$  aufgesucht (vgl. Abb. 8). Die Messung der Oberflächenrauheit fand in 216facher Vergrößerung bei einer Helligkeit von 50 % statt. Die Helligkeit ist dabei definiert als Quotient von Leistung und Strahlqualität. Die Neigung wurde in der Einstellung der Oberflächenkorrektur korrigiert. Die Grenzwellenlänge wurde mit  $\lambda_c = 800 \mu\text{m}$  festgelegt. Diese Grenze definiert den Übergang von Rauheit zur Welligkeit und entspricht damit der Einzelmessstrecke, die vom Laser zusammenhängend abgetastet wird. Rillen, die größer oder breiter als die Grenze sind, werden nicht detektiert.

Da der Knorpel vor der Behandlung mit RFE nur in eine Richtung geschliffen wurde, lieferte die Messung aus verschiedenen Winkeln bei hoher Rauheit eine erhöhte Abweichung der Rauheitswerte vom Mittelwert, was bereits in den Vorversuchen des RCBE festgestellt wurde. In diesen Fällen wurde der Mittelwert der Messungen aus verschiedenen Winkeln ermittelt und als Rauheitsmaß für das entsprechende Areal gewertet.

Lieferte die Messung einen Rauheitswert von  $S_q > 35 \mu\text{m}$ , so wurde das Areal zusätzlich um  $90^\circ$  im Uhrzeigersinn gedreht gemessen. Bei einem Wert von  $S_q > 40 \mu\text{m}$  fand eine Messung aus vier verschiedenen Winkeln statt (null Grad, entsprechend der ursprünglichen Position, dreißig Grad, sechzig Grad, neunzig Grad) (vgl. Abb. 8).



**Abbildung 8: Skizze: Aufsicht von oben, Anordnung der Präparate bei der Messung der Oberflächenrauheit mittels des CLSM in verschiedenen Winkeln ( $0^\circ$ ,  $30^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $90^\circ$ ) (lichtmikroskopische Aufnahme eines unbehandelten geschliffenen Präparates  $\times 0.7$ )**

Aufgrund von Artefakten, die teils durch die Fixierung und Trocknung entstanden sind, musste in einigen Fällen zur Berechnung der Rauheit ein kleinerer Ausschnitt der markierten Flächen gewählt werden. Manche Flächen mussten vollständig aus der Evaluation ausgeschlossen werden, weshalb die Stichprobenzahl für die verschiedenen Behandlungsweisen unterschiedlich ausfiel.

Neben der Berechnung des Rauheitswertes selbst können mit Hilfe des CLSM auch sehr eindruckliche zweidimensionale und dreidimensionale Aufnahmen von der Oberfläche generiert werden, welche zur Veranschaulichung der Ergebnisse dieser Studie dienen sollen.

#### **4.2.2 Ermittlung des Anteils abgestorbener Knorpelzellen**

Über ein konfokales Mikroskop wurden bei vierfacher Vergrößerung Aufnahmen der Schnitte mit Live/Dead-Färbung gewonnen. Diese wurden mit Fiji© (Open Source Projekt unter dem *Laboratory for Optical and Computational Instrumentation* (LOCI), University of Wisconsin-Madison, Wisconsin, USA, sowie dem *Max Planck Institute of Molecular Cell Biology and Genetics* (MPI-CBG), Dresden, Deutschland, <http://fiji.sc/>) [115], einer frei zugänglichen Software speziell zur Analyse biologischer Aufnahmen, ausgewertet. Jeweils drei Aufnahmen einer Bilderfolge eines Präparates wurden ausgewählt, davon jeweils mindestens eines aus dem mittleren behandelten Bereich und eines randständig. Mittels der Software Fiji© wurde bei jeder Aufnahme die Knorpelzellschicht markiert und der prozentuale Anteil roter (toter) und grüner (lebender) Zellen ermittelt. Dazu wurde die Aufnahme in einzelne Farbkanäle aufgeteilt (*split channels*), für welche das Programm jeweils den Anteil an Pixeln an der Gesamtfläche errechnet. Nach der Ermittlung der prozentualen Anteile grüner und roter Knorpelzellen an der Gesamtfläche wurden die prozentualen Anteile der farblich markierten Zellen an der Anzahl aller Knorpelzellen berechnet. Dies liefert den Anteil der initial abgestorbenen Knorpelzellen unmittelbar nach der entsprechenden RFE-Behandlung.

### 4.3 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der statistischen Software IBM® SPSS® Statistics 24.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) durchgeführt. Nach Erhebung der Daten erfolgte eine deskriptive Analyse.

Die Mittelwerte für die gemessenen Rauheitswerte der einzelnen Behandlungsgruppen sowie deren Standardabweichung wurden berechnet. Mittels Histogrammen wurden die Ergebnisse der einzelnen Gruppen veranschaulicht.

Die Rauheitswerte der verschiedenen Gruppen waren nach visueller Inspektion der Histogramme normalverteilt. Eine Testung mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests bestätigte die Normalverteilung der Daten. Lediglich die Behandlungsgruppe zweimalig zweisekündig gepulster Behandlung (B2p2) wies nicht normalverteilte Daten auf. Statistisch wurden die Fragestellungen der Studie mittels einfaktorieller ANOVA zweiseitig untersucht, ein Wert von  $p < .05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet. Varianzhomogenität war gemäß dem Levene-Test gegeben ( $p > .05$ ). Als Post-hoc-Test wurde der *Least-Significance-Difference-Test* ausgewählt, um Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen explorativ zu untersuchen und die Effekte der verschiedenen Behandlungsmuster zu vergleichen.

Bei der Auswertung der prozentualen Anteile abgestorbener Knorpelzellen wurden sowohl die Mittelwerte als auch deren Standardabweichungen berechnet. Zur Beurteilung der Ergebnisse wurde der Median als deskriptive Maßzahl gewählt, da bereits bei visueller Inspektion des Histogramms keine Normalverteilung festzustellen war. Für die statistische Auswertung wurde der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test mit zweiseitiger Testung gewählt. Auch hier wurde ein Wert von  $p < .05$  als statistisch signifikant erachtet. Eine graphische Veranschaulichung fand mittels Boxplot statt.

Zur Ermittlung der Rauheit war eine Grundgesamtheit von  $N = 178$  vorhanden. Die einzelnen Gruppen unterschieden sich in ihrer Stichprobengröße durch das vorherige Ausscheiden ungeeigneter Proben aufgrund von Artefakten, sodass die Gruppengröße zwischen  $n = 15$  und  $n = 28$  lag.

Der Rauheitswert wurde durch die Messung des Parameters  $S_q$  in Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) angegeben, auch bekannt unter dem Namen *Root-Mean-Square* (RMS).

Zur Vermessung der abgestorbenen Knorpelzellen lag eine Grundgesamtheit von  $N = 36$  vor, wobei für die sechs Behandlungsgruppen jeweils sechs Proben vorhanden waren. Der Anteil abgestorbener Knorpelzellen an allen Knorpelzellen wurde prozentual ermittelt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Der Glättungseffekt bipolarer RFE-Behandlung: Ergebnisse zur Rauheit des Knorpels

Zunächst wird auf die Glättung des Knorpels, den gewünschten Effekt der bipolaren RFE-Behandlung, eingegangen.

Wie im Abschnitt Material und Methoden genauer beschrieben, wurde mittels eines CLSM die Rauheit von mit RFE behandelten Knorpeloberflächen gemessen. Als Vergleichswerte zu den Behandlungsgruppen liegen sowohl Werte von nativem Knorpel (NK), als auch Werte von geschliffenem, noch unbehandeltem Knorpel (GUK) vor.

Der NK, welcher in unseren Präparaten am Randbereich der behandelten Flächen untersucht wurde, wies im Mittel ( $n = 24$ ) einen Rauheitswert von  $Sq = 3.8 \pm 1.1 \mu m$  auf. Dieser Referenzwert für die Rauheit von unbeschadetem unbehandeltem Knorpel stellt den niedrigsten Balken im unten angeführten Histogramm (vgl. Abb. 9) dar.

Die Rauheit von Knorpel mit einer Osteoarthrose Grad III wurde durch die Schleifung der Knorpeloberfläche mit Schleifpapier der Körnung P60 initiiert. Der Mittelwert der gemessenen Rauheit ( $n = 27$ ) des GUK betrug dabei  $Sq = 42.6 \pm 7.2 \mu m$ , was im Histogramm den Balken mit dem höchsten Rauheitswert darstellt.

Zwischen diesen beiden Mittelwerten liegen die gemittelten Rauheitswerte der verschiedenen Behandlungsgruppen (vgl. Tab. 2).

B1 ( $n = 19$ ) lieferte einen Mittelwert von  $Sq = 33.1 \pm 8.5 \mu m$  und B2 ( $n = 21$ ) einen Mittelwert von  $Sq = 31.3 \pm 7.4 \mu m$ .



Unter den behandelten Proben wurde nach B1p1 ( $n = 18$ ) der höchste Mittelwert mit  $Sq = 34.1 \pm 7.9 \mu\text{m}$  gefunden. Bei Wiederholung der gepulsten Behandlung B2p1 ( $n = 15$ ) wurde die Rauigkeit im Mittel auf  $Sq = 28.0 \pm 8.1 \mu\text{m}$  reduziert.

Den geringsten Mittelwert der gemessenen Rauheit lieferte die zweisekündig gepulste Behandlung, welcher bei B1p2 ( $n = 28$ ) einen Mittelwert von  $Sq = 30.2 \pm 8.6 \mu\text{m}$  und bei der zweiten Durchführung B2p2 ( $n = 26$ ) einen Mittelwert von  $Sq = 27.3 \pm 4.9 \mu\text{m}$  annahm.

In Tabelle 2 werden die Werte in genannter Folge der Behandlungsgruppen mit Angabe der Minima und Maxima sowie deren Stichprobengrößen übersichtlich dargestellt. Abbildung 9 dient der Veranschaulichung der Werte in einem Histogramm.

**Tabelle 2: Stichprobengrößen (n) sowie Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Minima (Min) und Maxima (Max) der Rauheitswerte in  $\mu\text{m}$  der verschiedenen Behandlungsgruppen;**  
Referenzwerte: GUK ( $n = 27$ ):  $Sq = 42.6 \pm 7.2 \mu\text{m}$ ; NK ( $n = 24$ ):  $Sq = 3.8 \pm 1.1 \mu\text{m}$

Behandlungsmuster	n	MW	SD	Min	Max
<b>B1:</b> Einmalige kontinuierliche Behandlung	19	33.1	8.5	19.6	53.7
<b>B2:</b> Zweimalige kontinuierliche Behandlung	21	31.3	7.4	19.0	50.2
<b>B1p1:</b> Gepulst einmal mit einem Behandlungsintervall von 1 s	18	34.1	7.9	20.3	49.9
<b>B2p1:</b> Gepulst zweimal mit einem Behandlungsintervall von 1 s	15	28.0	8.1	15.8	47.5
<b>B1p2:</b> Gepulst einmal mit einem Behandlungsintervall von 2 s	28	30.2	8.6	9.8	43.4
<b>B2p2:</b> Gepulst zweimal mit einem Behandlungsintervall von 2 s	26	27.3	4.9	15.6	35.4

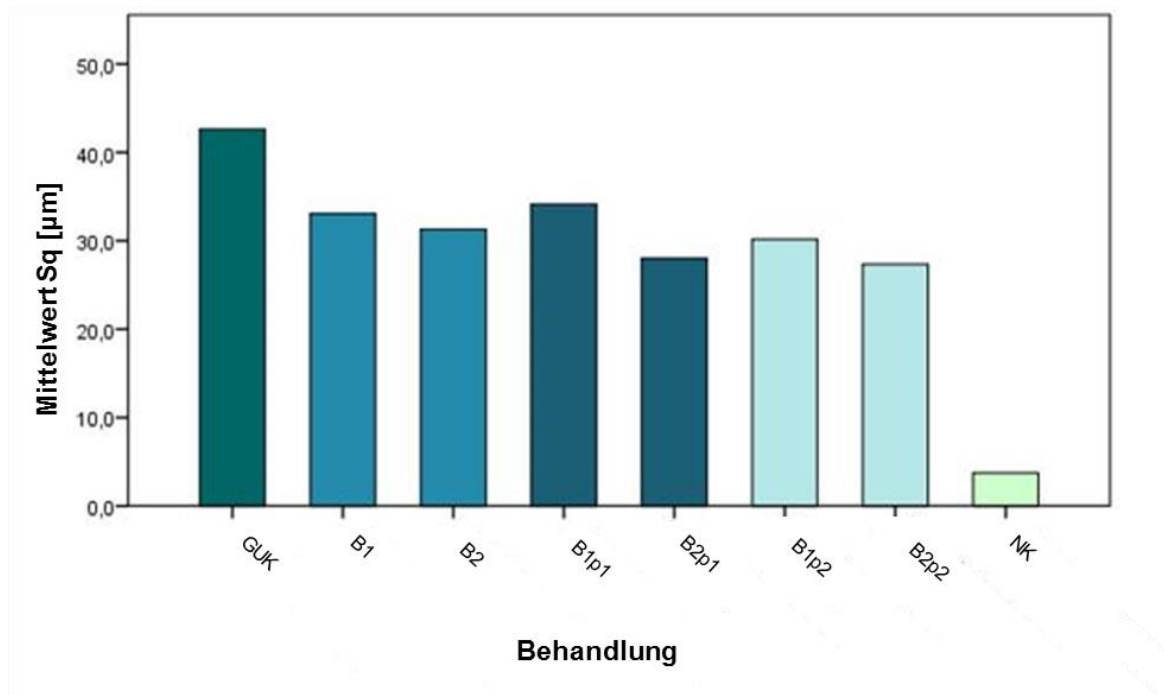


Abbildung 9: Histogramm der gemittelten Rauheitswerte der Knorpeloberfläche nach den verschiedenen Behandlungen (B1, B2, B1p1, B2p1, B1p2, B2p2) sowie des GUK und des NK, Behandlungen mit gleichem Behandlungsmuster werden in identischen Farben dargestellt

Lichtmikroskopisch konnte man kaum einen sichtbaren Glättungseffekt nach bipolarer RFE-Behandlung erkennen. In Einzelfällen, wie exemplarisch in der Abbildung 10 zu sehen, war nach der zweiten Behandlung ein Verschmelzen der durch die Schleifung verursachten scharfen Kanten der Knorpeloberfläche erkennbar.



Abbildung 10: Ausschnitte lichtmikroskopischer Aufnahmen (x 0.7) verschiedener Knorpeloberflächen (links GUK, mittig B2, rechts NK am Rande einer geschliffenen Knorpeloberfläche)

Es wurde eine einfaktorielle ANOVA berechnet. Die Wahl des Behandlungsmusters hat einen statistisch signifikanten Effekt auf den Rauheitswert der Knorpeloberfläche nach einer Behandlung,  $F(7, 170) = 62.39$ ,  $p < .001$ .

### **5.1.1 Effekte nach einmaliger Behandlung**

Der *Least Significant Difference (LSD)* Post-hoc-Test zeigt in allen Behandlungsgruppen bereits nach einmaliger Behandlung im Vergleich zum geschliffenen unbehandelten Knorpel jeweils einen signifikanten Unterschied,  $p < .001$ .

Die Rauheit nimmt von GUK zu B1 (9.58, 95 % - CI [5.45, 13.71]) ab. Auch nach B1p1 (8.50, 95 % - CI [4.30, 12.70]) ist eine Abnahme des Rauheitswertes von dem des GUK zu verzeichnen. Die stärkste Glättung findet nach B1p2 (12.47, 95 % - CI [8.75, 16.19]) statt.

### **5.1.2 Glättungseffekt nach Wiederholung der Behandlung**

Nach Wiederholung des jeweiligen Behandlungsmusters wurde lediglich bei einsekündig gepulster Behandlung ein signifikanter Unterschied zwischen einmaliger (B1p1) und zweimaliger Behandlung (B2p1) gefunden,  $p = .013$  (6.14, 95 % - CI [1.32, 10.96]). Bei den übrigen Behandlungsmustern ist nach Wiederholung der Behandlung eine Verminderung der Rauheit, jedoch nicht statistisch signifikant, messbar.

Nach der zweiten Behandlung unterscheidet sich die Rauheit der Knorpeloberfläche noch signifikant von der des nativen Knorpels,  $p < .001$ . Sowohl nach B2 (- 27.56, 95 % - CI [- 31.68, - 23.43]), als auch nach B2p1 (- 24.24, 95 % - CI [- 28.79, - 19.70]) und B2p2 (- 23.59, 95 % - CI [- 27.49, - 19.68]) findet sich eine weit höhere Rauheit der Knorpeloberfläche als bei dem NK.

### **5.1.3 Abhängigkeit des Glättungseffekts vom Behandlungsmuster**

Anhand der in Tabelle 2 präsentierten Werte kann man einen Unterschied in der Glättung des Knorpels bei Anwendung der verschiedenen Behandlungsmuster erkennen. Obwohl messbare Unterschiede vorliegen, gibt es zwischen den Behandlungsmustern bezüglich des gemessenen Rauheitswertes bei allen Untergruppen (kontinuierlich, p1, p2) weder nach einmaliger noch nach zweimaliger Behandlung einen statistisch signifikanten Unterschied.

B1p2 und B2p2 weisen unter den Behandlungsmustern jeweils den geringsten Rauheitswert auf (vgl. Abb. 9).

Im Anhang (vgl. Abb. 13 - 18) sind zwei- und dreidimensionale Aufnahmen des CLSM einer GUK, einer einmalig und zweimalig behandelten, sowie eines NK dargestellt. Da sich die verschiedenen Behandlungsmuster nicht signifikant bezüglich ihrer Rauheit voneinander unterscheiden, werden exemplarisch Aufnahmen des kontinuierlichen Behandlungsmusters präsentiert. Sichtbar ist bereits eine Verschmelzung der rauen Kanten nach einmaliger RFE-Behandlung. Die Aufnahmen der behandelten Knorpeloberflächen heben sich auch nach zweimaliger Behandlung noch deutlich durch ihre raue Oberfläche von denen des NK ab.

## **5.2 Der Untergang der Knorpelzellen durch bipolare RFE-Behandlung**

Zur Analyse des negativen Nebeneffekts der bipolaren RFE-Behandlung werden im folgenden Abschnitt die Ergebnisse der Auswertung der Live/Dead-Färbungen vorgestellt.

Prozentual wurde der Anteil roter Pixel an der Gesamtmenge der Pixel der Knorpelzellen ermittelt. Der rot fluoreszierende Farbstoff markiert den Zellkern toter Zellen, wohingegen die grüne Fluoreszenz in gesunden Zellen vorzufinden ist. Bei den Präparaten mit abgestorbenen Knorpelzellen zur Kontrolle der Wirksamkeit der Färbung wurden 99.9 % rote Pixel gemessen.

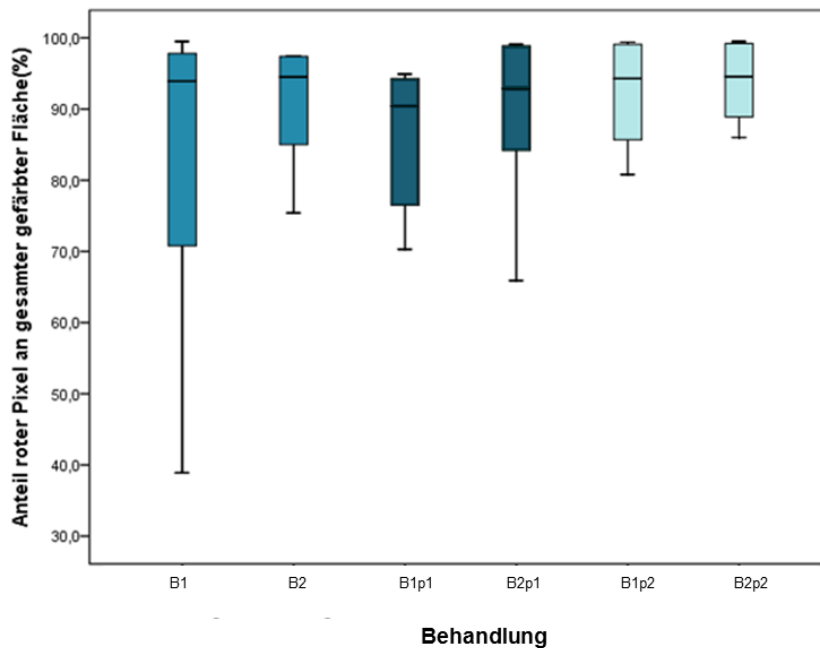
Da es sich bei diesem Datensatz um eine Nicht-Normalverteilung handelt, wird in der deskriptiven Analyse der jeweilige Median, sowie die 25. und 75. Perzentile des prozentualen Anteils toter Knorpelzellen angegeben.

Bei B1 war für tote Zellen ein Median von 93.9 % (62.8, 98.2) und bei B2 ein Median von 94.5 % (82.6, 97.4) zu messen.

Mit einem Median von 90.4 % (75.0, 94.5) bei B1p1 und 92.9 % (79.6, 99.0) bei B2p1, weist die einsekündige gepulste Behandlung die geringste Sterberate der Knorpelzellen unter allen getesteten Behandlungsmustern auf.

Der höchste Median findet sich bei der zweisekündigen gepulsten Behandlung mit einem Wert von 94.3 % (84.5, 99.2) bei B1p2 und 94.6 % (88.2, 99.3) bei B2p2.

In Abbildung 11 werden die Ergebnisse der genannten Reihenfolge nach geordnet graphisch in einem Boxplot dargestellt.



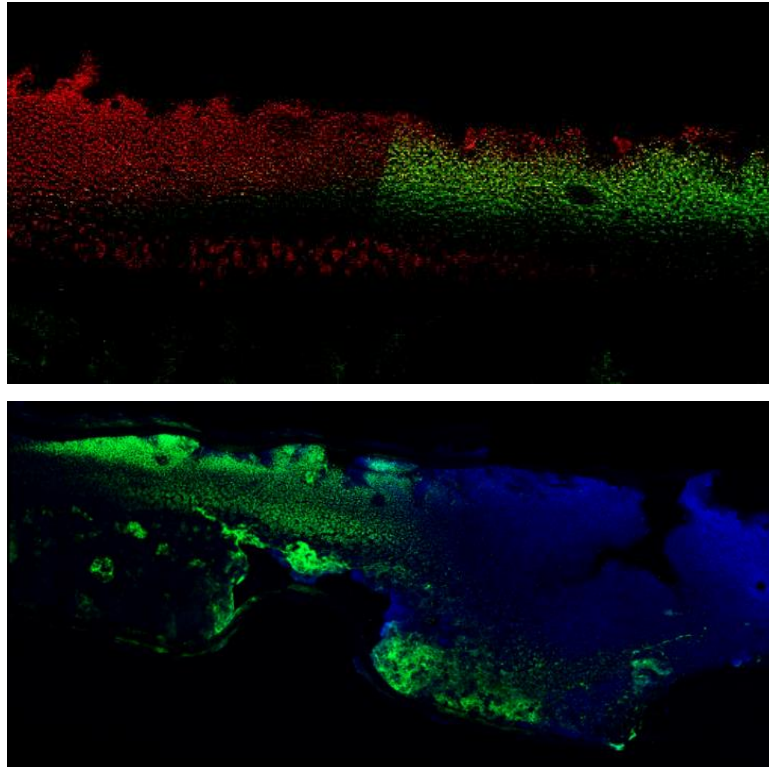
**Abbildung 11: Boxplot zur Veranschaulichung des Untergangs von Knorpelzellen nach den verschiedenen Behandlungsmethoden (B1, B2, B1p1, B2p1, B1p2, B2p2) gemessen am Anteil roter Pixel an der gesamten gefärbten Fläche in %. Der theoretische Minimalwert beträgt 0.0 %.**

Eine Zunahme des Zelluntergangs von einmaliger zu zweimaliger Behandlung fand in jeder Behandlungsgruppe statt. Gemessen anhand des Kruskal-Wallis-Tests gibt es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen hinsichtlich des Anteils toter Knorpelzellen,  $p = .744$ . Die hohe Absterberate der Knorpelzellen mit einem Median von über 90.0 % unabhängig von der Art der Behandlung wird im Boxplot (vgl. Abb. 11) deutlich.

An weiteren histologischen Schnitten wurden die durch die Live/Dead-Färbung erhaltenen Ergebnisse mittels der Caspase-Färbung visuell kontrolliert. Die Beobachtungen bestätigen den durch die Live/Dead-Färbung initial gemessenen Zelluntergang. Bereits 24 Stunden nach der Behandlung ist im behandelten Bereich eine Apoptose der Knorpelzellen bis zur Knochengrenze nachweisbar.

In Abbildung 12 wird der unmittelbare Knorpelzelluntergang durch die Live/Dead-Färbung sowie die Apoptose der Knorpelzellen 24 Stunden nach Behandlung durch die Caspase-Färbung exemplarisch dargestellt. Eindrücklich kann man die

schädliche Wirkung der bipolaren RFE auf die Knorpelzellen in Aufnahmen des Übergangs vom behandelten Knorpel zum unbehandelten sehen. In beiden Färbungen wird der Untergang der Knorpelzellen bis zur Knorpel-Knochengrenze im behandelten Bereich deutlich. Davon hebt sich jeweils der unbehandelte Randbereich mit den noch lebenden nicht apoptotischen Knorpelzellen deutlich ab.



**Abbildung 12:**

**Oben:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Live/Dead-Färbung eines Knorpelgewebes (x4), oben Knorpeloberfläche, unten subchondraler Knochen

**links:** rot fluoreszierender Farbstoff in Zellkernen abgestorbener Knorpelzellen nach B2

**rechts:** grün fluoreszierender Farbstoff im Cytoplasma lebender Knorpelzellen im unbehandelten Randbereich

**Unten:** Mittels Photoshop zusammengeführtes Bild mehrerer fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen (x4) einer Caspase-Färbung des Knorpelgewebes 24h nach B2p2, oben Knorpeloberfläche, unten subchondraler Knochen

**links:** grün fluoreszierender Farbstoff im Zellkern apoptotischer Knorpelzellen im behandelten Bereich, darunterliegend Knochengewebe

**rechts:** blau fluoreszierender Farbstoff in nicht von Apoptose betroffenen Knorpelzellen im unbehandelten Randbereich

## 6. Diskussion

Die Radiofrequenzenergie wird in der Handgelenksarthroskopie vielfältig zur Kapsel- und Bandschrumpfung, Synovektomie und Glättung des Knorpels verwendet. Als Alternative zum herkömmlichen mechanischen Debridement bietet sie durch den gezielteren Einsatz am Gewebe, den besseren Glättungseffekt und durch den einfacheren Gebrauch deutliche Vorteile, weshalb die RFE von Operateuren häufig bevorzugt wird [20, 39, 40, 46, 51, 93]. Zwar sind die Vorteile der RFE gegenüber dem Shaver vielfach erforscht, jedoch ist man auch auf negative Auswirkungen der RFE gestoßen [19, 42, 47–50]. Dies führte zur kritischen Hinterfragung der Behandlungsmethode mit Untersuchung der Auswirkungen einer RFE-Behandlung in vielen Publikationen [23, 42, 48, 50, 54, 89, 98]. Zentrales Thema ist dabei der Untergang der Knorpelzellen, der sich in verschiedenen Experimenten als ein Resultat der RFE-Behandlung zeigte [19, 47, 49, 101]. Die Untersuchungen variierten bezüglich des Gerätetyps, der Temperatur der Spülflüssigkeit, der Flussrate der Spülflüssigkeit, der Behandlungsdauer und der Wiederholungen der Behandlung [23, 81, 92, 97, 102–104, 106–108].

In dieser Studie wurde die Auswirkung bipolarer RFE an Knorpel des Tibiaplateaus von Schweinen getestet, da dieser der Dicke des Gelenkknorpels des menschlichen Handgelenks ähnlich ist [64]. Die RFE-Behandlung fand in vitro mit einer bipolaren RFE-Elektrode (DePuy Mitek VAPR® II, DePuy Mitek, Inc., MA, USA) unter Spülung mit einer Spülrate von 50 ml/min bei Raumtemperatur statt. Vor der Behandlung wurde die Rauheit der Knorpeloberfläche einer Osteoarthrose III. Grades nach Outerbridge durch die Aufrauung mit einem Schleifpapier (P60) simuliert. Bei der anschließenden RFE-Behandlung wurden verschiedene Behandlungsmuster angewendet (B1, B2, B1p1, B2p1, B1p2, B2p2), um mögliche Unterschiede in der Wirkung auf den Knorpel zu untersuchen.

Der Glättungseffekt, als positive Wirkung der bipolaren RFE-Behandlung, wurde mittels der Messung der Rauheit durch ein CLSM mit dem Parameter Sq ( $\mu\text{m}$ ) ermittelt. Hierbei handelt es sich um einen Parameter, der die Oberflächenrauheit von biologischen Proben sehr präzise beschreibt [113].



Der Untergang der Knorpelzellen als negativer Nebeneffekt wurde durch die Auswertung der Live/Dead-Färbung von histologischen Schnitten mittels Fiji© [115] untersucht und mit der visuellen Inspektion von Caspase-Färbungen kontrolliert.

## **6.1 Eigene Ergebnisse im Kontext der aktuellen Studienlage**

### **6.1.1 Der Glättungseffekt durch Anwendung bipolarer RFE**

Bereits nach einmaliger Behandlung konnte man bei allen Behandlungsmustern anhand des verminderten Rauheitswertes der Knorpeloberfläche eine Glättung im Vergleich zum unbehandelten Knorpel feststellen.

Eine Wiederholung des entsprechenden Behandlungsmusters führte in allen Behandlungsgruppen zu einer Abnahme des Rauheitswertes, jedoch war die Abnahme des Rauheitswertes von der einmaligen zur zweimaligen Behandlung nur bei B2p1 signifikant.

Insgesamt fielen die Rauheitswerte der gemessenen Knorpeloberflächen nach zweimaliger Behandlung noch sehr hoch im Vergleich zum nativen Knorpel aus. Mikroskopisch unterschied sich die behandelte Fläche noch deutlich von der glatten Oberfläche des nativen Knorpels. Auch makroskopisch waren zwar Verschmelzungen an der Oberfläche, jedoch keine deutliche Glättung zu erkennen. Um eine sichtbare Glättung des Knorpeldefektes zu erreichen, wie es in der Arthroskopie üblich ist, wären in diesem Setting noch weitere Wiederholungen nötig gewesen.

Dies steht in Einklang mit einer Studie von Lu et al., in der ebenso ein meanderförmiges Behandlungsmuster angewendet wurde [48]. Eine Glättung wurde dort, neben der bereits eher eintretenden Verschmelzung größerer Gewebsetzen, erstmals nach einer dreimaligen Behandlung festgestellt. Im Gegensatz zu unserer Studie mit einer Behandlungsdauer eines Durchgangs von mindestens achtzehn Sekunden benötigten sie für den einmaligen Durchgang standardisiert fünf Sekunden. Diese Untersuchung wurde mit einer Versuchsanordnung durchgeführt, bei

der die RFE Sonde mit einem definierten Druck und einer definierten Geschwindigkeit über das zu behandelnde Areal bewegt wurde.

Unsere Beobachtung, dass eine zweimalige Anwendung des Behandlungsmusters zu einer makroskopisch sichtbaren Glättung nicht ausreicht, bestätigt das Ergebnis der Studie. Auch die Verschmelzung der Fasern der Knorpeloberfläche, welche als Vorstufe der Knorpelglättung bezeichnet werden kann, zeigte sich bereits mit der Abnahme des Rauheitswerts  $S_q$  nach einmaliger Behandlung der rauen Knorpeloberfläche.

Folglich ist weniger die Behandlungszeit, sondern vielmehr die Anzahl der Wiederholungen einer Behandlung für den Glättungseffekt verantwortlich. Bereits eine einmalig kontinuierliche Behandlung dauerte in unserem Setting achtzehn Sekunden, die gepulsten Behandlungen aufgrund der Pausen entsprechend länger. Hier konnte visuell noch keine ausreichende Glättung, trotz entsprechend längerer Behandlungszeit, festgestellt werden.

Dahingegen reicht laut Kosy et al. ein einziger Durchgang mit der Elektrode über den Knorpel für einen stabilen Rand aus, mit dabei nur geringem Zellschaden. Weitere Passagen seien nicht wirksam [18].

Da wir nach einer Wiederholung der Behandlung keine signifikant bessere Glättung gegenüber der einmaligen Behandlung feststellen konnten, benötigt es die Durchführung und Auswertung weiterer Wiederholungen, um deren Wirksamkeit bestätigen oder ausschließen zu können.

Unserer Studie nach steht jedoch fest, dass selbst die zweimalige Passage einer bipolaren RFE-Elektrode über die Knorpeloberfläche noch nicht für eine gewünschte Glättung ausreicht. Einen Schaden nimmt dagegen bereits ein Großteil der Knorpelzellen von einer einmaligen Behandlung.

Die verschiedenen Behandlungsmuster unterscheiden sich bezüglich des Rauheitswertes weder nach einmaliger noch nach zweimaliger Behandlung signifikant voneinander. Es gibt bisher keine weitere Studie in der derartige Behandlungsmuster miteinander verglichen wurden. Auch hier muss bedacht werden, dass keine weiteren Wiederholungen bis zur makroskopisch sichtbaren Glättung stattfanden, sodass über Unterschiede des Glättungseffekts der

verschiedenen Behandlungsmuster im weiteren Verlauf der Behandlung noch Unkenntnis herrscht.

### **6.1.2 Untergang der Knorpelzellen als negativer Effekt bipolarer RFE-Behandlung**

In dieser Studie wurden verschiedene Behandlungsmuster (B1, B2, B1p1, B2p1, B1p2, B2p2) auf Unterschiede im Untergang der Knorpelzellen untersucht. Die Knorpeldicke der Proben aus dem Tibiaplateau vom Schwein betrug 1 – 2 mm. Die Behandlungsdauer variierte je nach Behandlungsmuster zwischen 18 s und 90 s.

Da Knorpelzellen bei Temperaturen von 50 – 55 °C durch den Einstrom von Calcium irreversibel zugrunde gehen, sind Spitzentemperaturen darüber hinaus während einer RFE-Behandlung zu vermeiden [53]. Edwards et al. berichten über Temperaturen von 75 - 78 °C nach bipolarer RFE-Behandlung selbst noch in einer Tiefe von 2000 µm unterhalb der Knorpeloberfläche [54]. Entsprechend ist auch das Absterben der Knorpelzellen bis in die Tiefe zu erwarten, was Edwards et al. in einer weiteren Studie bestätigen [47]. Höchsttemperaturen oberhalb der für Knorpelzellen schädlichen Temperatur wurden auch von Shellock beschrieben [100]. Bei einer Chondroplastik im Handgelenk birgt gerade der kleine Gelenkraum die Gefahr der Entstehung von zu hohen Temperaturen. Dies wurde in einer Studie von Huber et al. bestätigt [23]. Nach Beendigung einer RFE-Behandlung wurde dabei ein schneller Temperaturabfall subchondral festgestellt.

Es ergab sich die Frage, ob nach gepulster Behandlung, bei der es zu einem Temperaturabfall in den Pausen kommen kann, geringere Höchsttemperaturen entstehen und somit die Rate des hitzeinduzierten Zelltods gesenkt werden kann. Daher wurden in unserer Studie die Effekte zweier gepulster Behandlungen (Behandlungsintervall von 1 s und 2 s) der kontinuierlichen Behandlung gegenübergestellt. Es soll nicht nur die absolute Temperaturhöhe, sondern auch die Dauer der Temperatureinwirkung einen Einfluss auf die Apoptose der Knorpelzellen haben [88, 100]. So unterschied man bei der gepulsten Behandlung zwischen einsekündigen und zweisekündigen Behandlungsintervallen.

Betrachtet man das Absterben der Knorpelzellen in der Live/Dead-Färbung, so starben bereits nach einmaliger Behandlung mehr als 90 % der Knorpelzellen bis in die Tiefe zur Knorpel-Knochen-Grenze unabhängig vom Behandlungsmuster ab. Nach der zweiten Behandlung kam es zu einem nicht signifikanten Mehranstieg des Anteils toter Knorpelzellen. Zwischen den Behandlungsmustern gibt es keinen signifikanten Unterschied des prozentualen Anteils toter Knorpelzellen. Das Absterben der Knorpelzellen nach gepulster Behandlung unterscheidet sich nicht von dem nach kontinuierlicher Behandlung. Die negative Auswirkung bereits einer einmaligen bipolaren RFE-Behandlung auf die Knorpelzellen unabhängig vom Behandlungsmuster ist beachtlich.

Von Kaplan et al. wurde auf einen sicheren Gebrauch der RFE geschlossen, nachdem lichtmikroskopisch keine Zellstrukturveränderungen nach RFE-Behandlung sichtbar waren [20].

In einer bereits erwähnten Studie von Lu et al. wurde trotz unauffälliger lichtmikroskopischer Inspektion der Knorpelzellen deren Zelltod festgestellt, nachdem man zusätzlich ein konfokales Lasermikroskop zur Auswertung des Knorpelzelltods verwendete [50]. Die bipolare RFE-Behandlung menschlichen Knorpels des distalen Femurs verursachte bei allen Exemplaren einen Untergang der Knorpelzellen bis auf die Grenze zum subchondralen Knochen, nachdem man die Knorpeloberfläche bis zum Eintreten der gewünschten Glättung behandelt hatte.

In einer weiteren Studie von Lu et al. wurde der Zelltod bis zur Knorpel-Knochen-Grenze bei einer Knorpeldicke von 2 – 3 mm nach bipolarer RFE-Behandlung bestätigt [19].

In späteren Versuchen ging man auf den Untergang der Knorpelzellen abhängig von der Behandlungsdauer ein.

Bereits nach einer Behandlungszeit von drei Sekunden war ein Absterben der Knorpelzellen feststellbar [48]. Die Anzahl toter Knorpelzellen nahm bis zu einer Behandlungsdauer von vierzig Sekunden zu, bei der dann alle Knorpelzellschichten vom Zelluntergang betroffen waren. Auch hier handelte es sich um menschlichen Knorpel des distalen Femurs, welcher physiologisch 2 – 4 mm dick ist [65, 66]. Der vielfach berichtete Knorpelzelltod bis in tiefe Knorpelschichten eines bis zu 4 mm

dicken Knorpels bestärkt das Ergebnis unseres Versuchs mit nur 1 – 2 mm dicken Knorpelschichten.

Die Empfehlung von Kosy et al., die Sonde kontinuierlich zu bewegen, um einen thermalen Knorpelzellschaden zu minimieren [18], kann von unserer Seite aus nicht weitergegeben werden. Trotz beständiger Bewegung der RFE-Elektrode und nur einmaligem Passieren der Sonde über die Knorpeloberfläche kam es in unserer Studie zu erheblicher Apoptose der Knorpelzellen bis zur Knorpel-Knochen-Grenze.

In einem Vergleich zweier bipolarer Geräte bei der Anwendung an Rinderknorpel in vitro, fanden Amiel et al. hingegen tote Knorpelzellen lediglich bis in eine Tiefe von 200 µm [101]. Die Schichten unmittelbar über dem subchondralen Knochen blieben immer unversehrt. Der Versuchsaufbau ist mit unserem Setting vergleichbar. Die Knorpeldicken der behandelten Proben ähneln sich (Rind Femurkondyle: 1.7 mm, Schwein Tibiaplateau: 1 - 2 mm) [63, 116]. In der vorgestellten Studie wurden zwei bipolare Elektroden der Firma ArthroCare verwendet (2.5mm/90°, ACD-50), welche sich möglicherweise in ihrer Wirkung auf den Knorpel von der in unserer Studie verwendeten bipolaren RFE-Elektrode (DePuy Mitek VAPR® II, DePuy Mitek, Inc., MA, USA) unterscheiden. Weiter könnte die händische Führung der RFE-Elektroden zu den unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich des Knorpelzelltods geführt haben. Dieser experimentelle Untersuchungsaufbau kommt dem operativen Setting näher als automatisierte Apparaturen, die eine standardisierte Behandlung mit gleichem Druck, gleichem Abstand zur Knorpeloberfläche und gleichem Zeitintervall durchführen. Die Reproduzierbarkeit ist jedoch wegen der Abhängigkeit von der behandelnden Person eingeschränkt. Kritisch zu betrachten ist die Temperatur der Spülflüssigkeit in unserer Studie von 21 - 23 °C, wohingegen in der Studie von Amiel et al. die Temperatur der Flüssigkeit 28 °C betrug. Je kühler die Flüssigkeit, desto mehr Energie muss von den Elektroden abgegeben werden, um eine für die Knorpelglättung wirksame Temperatur zu erreichen.

Dieses Phänomen konnten Lu et al. bei Experimenten mit monopolarer RFE an von Patienten entnommenen Proben feststellen. Bei der Behandlung mit einer Spülflüssigkeit von 37 °C im Vergleich zu einer von 22 °C starben deutlich weniger Knorpelzellen ab [97].

Auch Huang et al. konnten diesbezüglich einen Unterschied feststellen. Im Vergleich der Temperaturen der Spülflüssigkeit von 4 °C, 22 °C und 37°C fiel der Anteil toter

Knorpelzellen bei Nutzung einer Spülflüssigkeit mit 37 °C am geringsten aus [107]. Dies könnte die Ursache für das in unserem Modell vermehrte Absterben von Knorpelzellen im Vergleich zu dem geringeren Knorpelzelltod in der Studie von Amiel et al. sein.

Dennoch sterben selbst bei höheren Temperaturen der Spülflüssigkeit noch immer Knorpelzellen ab, was man den genannten Studien entnehmen kann. Auch Caffey et al. beschreiben, wenn auch in geringerem Ausmaß, Knorpelzelluntergang nach bipolarer RFE-Behandlung in einer Kochsalzlösung von 37 °C [117]. So ist die RFE-Behandlung selbst bei Anwendung der Spülflüssigkeit auf Höhe der Körpertemperatur sehr kritisch zu betrachten. Möglicherweise spielt dabei auch die Art und Zusammensetzung der Spülflüssigkeit eine Rolle.

Menschlicher Knorpel hat im Vergleich zu den Knorpeln anderer Säugetiere die geringste Knorpelzellichte, wobei sich der größere Anteil der Knorpelzellen in den oberen Schichten des Knorpels befindet [3, 31, 116]. Demzufolge kann eine Apoptose der Knorpelzellen allein in den oberen Schichten bereits erhebliche Folgen mit sich bringen.

Beachtlich ist auch die bei einer Behandlung vorliegende Knorpeldicke. Insbesondere bei der Behandlung am Handgelenk findet man sehr dünnen Knorpel vor, sodass es dort früh zu einem Untergang der Knorpelzellen bis in die Tiefe der Knorpel-Knochen-Grenze kommen kann [23]. Mit seiner Dicke von 1 – 2 mm kommt der von uns für die Studie gewählte Schweineknorpel dem Handgelenksknorpel mit einer Dicke von 0.7 – 1.2 mm sehr nahe [64]. Nach unseren Ergebnissen ist die Glättung des Knorpels mit bipolarer RFE insbesondere bei dünnen Knorpelschichten, wie in der Handgelenksarthroskopie oft genutzt, nicht zu empfehlen, da lebende Knorpelzellen für die Funktionalität des Knorpelgewebes durch deren Erhaltung der Matrix unabdingbar sind [6, 12, 31, 57].

## 6.2 Methodik

In unserer Studie wurde eine 2.3 mm Flügelelektrode des DePuy Mitek VAPR® II (DePuy Mitek, Inc., MA, USA) im Koagulationsmodus in der vom Hersteller empfohlenen Einstellung als einziges bipolares Gerät auf dessen Effekte getestet. Es gibt bereits Studien, welche einen Unterschied bezüglich des Untergangs der Knorpelzellen zwischen verschiedenen bipolaren Geräten bei gleichen Behandlungsbedingungen feststellten.

In einer Studie von Huang et al. kam es bei der Anwendung bipolarer RFE mit dem Gerät Paragon T2 zu einem geringeren Absterben von Knorpelzellen als mit ArthroCare TriStar 50 [107].

Caffey et al. verglichen vier verschiedene bipolare Geräte, welche bei Knorpelglättung immer einen Zelluntergang verursachten, aber auch hier in einem unterschiedlichen Ausmaß [117].

Auch Meyer et al. fanden Unterschiede zwischen verschiedenen Geräten bezüglich deren Einfluss auf das Absterben der Knorpelzellen [118]. Man gruppierte die Geräte nach dem isolierenden Material der Elektroden. Sonden mit Macor sowie mit Zirkoniumoxid gehärtetem Aluminium führten zu 35 % weniger toten Knorpelzellen als Elektroden mit Aluminiumnitrid, Teflon oder teilstabilisiertem Zirkoniumoxid.

Eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist daher nur mit einem identischen Gerät gesichert.

Die Wirkung bipolarer RFE auf den Knorpel wird nicht nur von außen beeinflusst. Die Eigenschaften des behandelten Knorpels selbst können die Effekte einer Behandlung beeinflussen.

Bereits mit der Gewebeentnahme aus einem lebendigen Organismus findet eine fortschreitende autolytische Zersetzung statt, welche die Leitfähigkeit des Knorpelgewebes beeinflusst [83, 119]. Auch wenn in unserer Studie das entnommene Gewebe unmittelbar gekühlt und nach dem Experiment fixiert wurde, gewährleistet dies nicht die gleiche Reaktion wie die Reaktion auf eine RFE-Behandlung eines Knorpelgewebes in einem lebenden Organismus.

Zudem ist die Leitfähigkeit des Gewebes stark von dessen Wassergehalt abhängig. Bereits geringe Änderungen des Wassergehalts können einen Unterschied in der

Leitfähigkeit des Gewebes und somit in der Wirkung der RFE auf den Knorpel verursachen [119]. So kann gesunder Knorpel, welcher einen höheren Wassergehalt hat, anders auf eine RFE-Behandlung reagieren als bereits degenerativ veränderter Knorpel.

Der von uns verwendete Schweineknorpel wurde mit Schleifpapier aufgeraut, um an der Knorpeloberfläche die Rauheit einer OA III. Grades zu imitieren. Es handelt sich hierbei nicht um einen degenerativ veränderten Knorpel, sondern um einen ursprünglich gesunden. Dieses entscheidenden Unterschieds sollte man sich bei der Bewertung der Ergebnisse bewusst sein. Da arthrotischer Knorpel nachweislich empfindlicher auf hohe Temperaturen reagiert [84], ist aber anzunehmen, dass es dort bei einer RFE-Behandlung zu früheren ähnlichen Effekten kommt.

Auch der Glättungseffekt, welcher durch die Veränderung des Kollagens bei Temperaturen ab 60 °C bewirkt wird, kann im individuellen Knorpelgewebe variieren. Der Glättungseffekt ist abhängig von der Qualität des Kollagens, welche sich mit dem Alter des Patienten verändert [39, 120]. Aufgrund der Anwendung der RFE an Schweineknorpel ist die Aussagekraft über die Reaktion des Kollagens im Knorpel eines Patienten in dieser Studie limitiert.

Zur Beurteilung unseres Modells ist hinzuzufügen, dass es sich hierbei um keinen geschlossenen Gelenkraum handelt. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die Temperaturentwicklung am Knorpel bei der RFE-Behandlung in vivo anders verhält und zu anderen Ergebnissen führt.

Die Oberflächenrauheit der Knorpelproben wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) gemessen. Derzeit gibt es nicht viele Studien, die diese Methode zur Messung der Oberflächen biologischen Materials verwenden. Laut Tomovich et al. ist das CLSM eine Apparatur, mit der man die Rauheit einer biologischen Oberfläche sehr präzise messen kann [113]. Sie ist gut geeignet, nicht nur zwei- sondern auch dreidimensionale Bilder der Oberflächenstruktur zu erstellen. Die Korrektur der Neigung stellt dabei einen wichtigen Schritt in der Auswertung dar, ebenso wie die Festlegung der Grenzwellenlänge.



Eine genauere Messung der Rauheitswerte sei durch das Zusammenfügen einzelner Bilder zu einer größeren Fläche möglich. Hierbei mangelt es noch an Techniken, welche den Einfluss störender Artefakte auf die Rauheitswerte minimiert [113]. In unserer Studie mussten häufig sehr kleine Flächen gemessen werden, da Artefakte sonst die Werte stark verfälscht hätten. Es wurde eine hohe Zahl an Flächen derselben Knorpelbehandlung gemessen, woraus ein Mittelwert errechnet wurde. Für weitere Studien zur Messung der Oberflächenrauheit von Knorpel ist definitiv das Minimieren von Artefakten bei der Herstellung der Proben empfehlenswert. Möglich wäre dies durch eine apparative Schleifung der Knorpeloberfläche sowie eine unmittelbare Messung nach der Behandlung.

Interessant wäre bei zukünftigen Experimenten die Messung des Rauheitswertes von jeder einzelnen Probe vor ihrer entsprechenden Behandlung. Dies ermögliche die Dokumentation einer Variabilität der Rauheit zwischen den Knorpelproben. Ein Glättungseffekt könnte für jede Probe individuell berechnet werden.

Bezüglich der Auswertung der Live/Dead-Färbungen ist von einer Reproduzierbarkeit trotz der geringen Anzahl an Aufnahmen pro Behandlungsmuster auszugehen. Die Ergebnisse unterschieden sich nur geringfügig.

Bei der von uns berechneten Prozentzahl muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die rote Fluoreszenz vom Zellkern ausgeht, wohingegen die Fläche der grünen Fluoreszenz dem Cytoplasma entspricht. Da in unserer Studie die Pixel entsprechend gefärbter Flächen ausgewertet wurden, kann eine Berechnung, welche das entsprechende Volumen berücksichtigt, minimal anders ausfallen. Ein unserem Ergebnis ähnlich hoher Anteil toter Knorpelzellen ist anzunehmen. Da sich die Behandlungsmuster nur gering voneinander unterscheiden und unabhängig davon ein sehr hoher Anteil der Knorpelzellen abgestorben ist, ist die Differenz der Flächen von Zellkern und Cytoplasma in diesem Fall zu vernachlässigen.

Rauch et al. verglichen die Live/Dead-Färbung mit einer histochemischen Färbung mit Laktatdehydrogenase [121]. Knorpelimplantate von Ratten wurden mit RFE behandelt und der Anteil noch lebender Zellen im Anschluss über die verschiedenen Färbungen ermittelt, was unterschiedliche Zahlen an noch vorhandenen lebenden

Zellen lieferte. In der Live-/Dead-Färbung wurden mehr lebende Knorpelzellen detektiert als bei der Färbung mit Laktatdehydrogenase. Bei unbehandelten Proben war es genau umgekehrt. Dies liegt wohl an der unterschiedlichen Reaktion der Enzyme auf die thermische Einwirkung der RFE.

In einer Studie von Kaplan et al. wird vor einem *Overreporting* des Knorpelzelltods nach Beurteilung einer Live/Dead-Färbung gewarnt [122]. Der rot fluoreszierende Farbstoff, welcher den Zellkern abgestorbener Knorpelzellen markieren soll, gelangt über offene Poren der Zellmembran ins Innere der Zelle. Der Studie nach soll eine Porenöffnung auch temporär durch den Temperaturanstieg während der RFE-Behandlung möglich sein, welche nicht unbedingt mit einem Zelluntergang verbunden sein muss. Die Reversibilität des vermeintlichen Untergangs der rot markierten Zellen hielt sich aber in Grenzen. Zum Vergleich verschiedener Versuche sei die Methode nach wie vor anwendbar, nur eine Annahme der exakten Zahl an abgestorbenen Zellen sei nicht hinnehmbar [18].

Dieser vermeintliche Effekt wurde in unserer Studie mittels der Caspase-Färbung visuell kontrolliert. Das in den Live/Dead-Färbungen sichtbare Absterben der Knorpelzellen wurde bestätigt, sodass die Vermutung von Kaplan et al. revidiert werden muss. Die Ergebnisse zum negativen Effekt der bipolaren RFE-Behandlung sind sehr ernst zu nehmen. Eine Anwendung bipolarer RFE sollte man entsprechend kritisch hinterfragen.

### 6.3 Ausblick

Im Gegensatz zu den experimentellen Studien weist die Anwendung bipolarer RFE zur thermalen Chondroplastik in klinischen Studien vorwiegend positive Ergebnisse auf. Owens et al. berichten von besseren Ergebnissen nach einer Behandlung mit bipolarer RFE im Vergleich zum mechanischen Debridement und auch Spahn et al. bestätigen diese Ergebnisse [39, 40, 93]. Die Zufriedenheit der Patienten sei höher, Schmerzen fallen geringer aus und die Mobilität des Gelenks wird gesteigert. Auch die Operation selbst verlief besser.

In einer retrospektiven Studie von Gharaibeh et al. wurde eine große Kohorte prä- und postoperativ mittels verschiedener Scores zum persönlichen Befinden über ihre Kniebeschwerden befragt [95]. Die Behandlung durch bipolare RFE führte zu deutlich positiven Ergebnissen.

Auch nach Darlis et al. gaben 17 von 20 Patienten 22 Monate nach Debridement des triangulären fibrokartilaginären Komplexes durch RFE eine erhebliche Schmerzlinderung an [123]. Der Schmerz und die dadurch entstehende Bewegungseinschränkung scheinen aus Sicht der Patienten durch eine bipolare RFE-Behandlung wirksam minimiert zu werden.

Allerdings bleibt unklar, ob eine Schmerzreduktion durch eine Inhibierung oder Verzögerung der Knorpeldegeneration bewirkt wird oder ob dieser Prozess lediglich auf der Koagulation intraartikulärer sensorischer Rezeptoren beruht [124].

Trotz der größtenteils positiven Ergebnisse arthroskopischer Second Looks, in denen auch mehrfach eine Füllung des Defekts nach bipolarer RFE beobachtet werden konnte, gibt es auch Fälle, in denen es zu einer Progression der Läsion kam [94, 96, 125].

Die initiale Schmerzreduktion nach einer Behandlung stellt einen positiven Effekt der RFE-Behandlung dar. Da die Knorpelzellen für den Erhalt des Knorpelgewebes essentiell sind, ist es fraglich, ob sich das initial positive klinische Outcome im weiteren Verlauf als positiv bestätigt. Angesichts des experimentell vielfach bewiesenen Untergangs der Knorpelzellen nach bipolarer RFE-Behandlung sind

definitiv Langzeitstudien nötig, um den klinischen Verlauf der Genesung beobachten zu können.

Zukünftig sollte man den in experimentellen Studien bewiesenen Untergang der Knorpelzellen mit in die Entscheidung über eine Anwendung bipolarer RFE zur thermalen Chondroplastik einbeziehen. Von unserer Seite ist von der Behandlung des Knorpels bei Osteoarthrose mit bipolarer RFE in kleinen Gelenken mit geringer Knorpeldicke bis zu der Sicherung einer unbedenklichen Anwendung durch Langzeitstudien abzuraten.

## 7. Zusammenfassung

Nach Anwendung bipolarer RFE wurde der Untergang von über 90 % der Knorpelzellen bei einer sichtbaren Verschmelzung der Knorpeloberfläche mit unzureichender Glättung festgestellt. Verschiedene Behandlungsmuster (B1, B2, B1p1, B2p1, B1p2, B2p2) unterschieden sich dabei nicht signifikant voneinander.

Diese inakzeptable Wirkung einer RFE-Behandlung auf die Knorpelzellen geschieht verborgen vor den Augen des Operateurs. Tagtäglich wird die bipolare RFE zur Knorpelglättung eingesetzt und gaukelt dem Operateur ein makroskopisch zufriedenstellendes Ergebnis im Vergleich zum präoperativen Befund vor. Dabei ist ihm kein tieferer Einblick in das Knorpelgewebe und die darin enthaltenen Knorpelzellen möglich. Patienten berichten sehr positiv über das initiale Ergebnis nach einer bipolaren RFE-Behandlung. Die Langzeitwirkung ist jedoch nicht ausreichend erforscht.

Knorpelzellen sind für den Erhalt des Knorpelgewebes und der damit einhergehenden Funktionalität des Gelenkknorpels essentiell. Die Regenerationsfähigkeit des Knorpels ist sehr eingeschränkt. Negative Effekte auf die Knorpelzellen bei der Behandlung einer Osteoarthrose durch RFE sollten daher vermieden werden.

In Anbetracht des von uns, wie auch in vielen weiteren Studien, bewiesenen ausgeprägten Untergangs von Knorpelzellen, raten wir von der Anwendung bipolarer RFE zur Knorpelglättung, insbesondere in kleinen Gelenken, ab. Eine Abklärung langfristiger Folgen für den Patienten durch Langzeitstudien ist wünschenswert.

## **8. Publizierte Teilergebnisse dieser Arbeit**

Auf den folgenden Seiten ist der Artikel *Quantitative Analysis of Surface Contouring with Pulsed Bipolar Radiofrequency on Thin Chondromalacic Cartilage* mit Teilergebnissen dieser Studie, veröffentlicht am 28. Februar 2020 im BioMed Research International 2020, abgebildet [55].

## Research Article

# Quantitative Analysis of Surface Contouring with Pulsed Bipolar Radiofrequency on Thin Chondromalacic Cartilage

Michaela Huber<sup>1</sup>, Daniela Schlosser<sup>2</sup>, Susanne Stenzel<sup>2</sup>, Johannes Maier<sup>3</sup>,  
Girish Pattappa<sup>2</sup>, Richard Kujat<sup>2</sup>, Birgit Striegl<sup>4</sup> and Denitsa Docheva<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Trauma Surgery & Emergency Department, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany

<sup>2</sup>Experimental Trauma Surgery, Department of Trauma Surgery, University Medical Center Regensburg, Regensburg, Germany

<sup>3</sup>Regensburg Medical Image Computing (ReMIC), OTH Regensburg, Regensburg, Germany

<sup>4</sup>Center of Biomedical Engineering, OTH Regensburg, Regensburg, Germany

Correspondence should be addressed to Michaela Huber; michaela1.huber@ukr.de

Received 12 September 2019; Revised 10 January 2020; Accepted 29 January 2020; Published 28 February 2020

Academic Editor: José L. Campos

Copyright © 2020 Michaela Huber et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The purpose of this study was to evaluate the quality of surface contouring of chondromalacic cartilage by bipolar radio frequency energy using different treatment patterns in an animal model, as well as examining the impact of the treatment onto chondrocyte viability by two different methods. Our experiments were conducted on 36 fresh osteochondral sections from the tibia plateau of slaughtered 6-month-old pigs, where the thickness of the cartilage is similar to that of human wrist cartilage. An area of 1 cm<sup>2</sup> was first treated with emery paper to simulate the chondromalacic cartilage. Then, the treatment with RFE followed in 6 different patterns. The osteochondral sections were assessed for cellular viability (live/dead assay, caspase (cell apoptosis marker) staining, and quantitative analysed images obtained by fluorescent microscopy). For a quantitative characterization of none or treated cartilage surfaces, various roughness parameters were measured using confocal laser scanning microscopy (Olympus LEXT OLS 4000 3D). To describe the roughness, the Root-Mean-Square parameter (Sq) was calculated. A smoothing effect of the cartilage surface was detectable upon each pattern of RFE treatment. The Sq for native cartilage was  $Sq = 3.8 \pm 1.1 \mu\text{m}$ . The best smoothing pattern was seen for two RFE passes and a 2-second pulsed mode (B2p2) with an  $Sq = 27.3 \pm 4.9 \mu\text{m}$ . However, with increased smoothing, an augmentation in chondrocyte death up to 95% was detected. Using bipolar RFE treatment in arthroscopy for small joints like the wrist or MCP joints should be used with caution. In the case of chondroplasty, there is a high chance to destroy the joint cartilage.

## 1. Introduction

In recent years, treatment of cartilage degeneration with radiofrequency energy (RFE) remains controversial. Many experimental studies have shown that using RFE can lead to severe chondrocyte damage, if temperatures above 45°C are applied directly to the cartilage layer [1–3]. The chondrocyte death rate is proportional to the temperature increase. Edwards et al. reported a 40% chondrocyte death rate at a temperature of 55°C and almost 100% at 65°C [4]. The temperature elevation during an arthroscopic procedure is also time-dependent, as the longer the RFE electrode is activated, the higher is the temperature. However, several studies demonstrated that an activation of the energy flow

between 3 and 10 seconds should be safe enough for use in arthroscopy [5, 6].

The positive effect of RFE compared to mechanical debridement is the “sealing effect” of the cartilage layer that stabilizes the damaged cartilage [7–12]. However, this “sealing effect” is also time-dependent. RFE of 15 seconds via a monopolar device resulted in a visibly smoother cartilage surface, as observed using electron microscopy, whilst a similar effect was also obtained with a bipolar device. However, in the latter case, a deeper chondrocyte damage was noted [13]. The above experiments were conducted on fresh osteochondral sections with chondromalacic cartilage from patients undergoing knee arthroplasty. An area of 1 cm<sup>2</sup> was placed in a custom designed holder and treated with a meander-like pattern

and cooled with a lavage fluid (22°C). In our opinion, these results cannot be compared to the impact of RFE in the arthroscopy of the wrist, due to the fact that the thickness of human knee cartilage is between 3 and 4 mm [14], whilst the cartilage layer in the wrist is between 0.7 and 1.2 mm [15]. Furthermore, a previous study has reported that a single RFE application of 2 seconds during wrist arthroscopy [5] reaches a mean temperature of around 24°C in the subchondral layer.

In our present study, we evaluated the smoothness of the cartilage surface generated by different RFE treatment patterns, as well as the vitality and apoptosis of the cartilage resident cells using a detailed quantitative analyses [16]. Based on the above literature evidence, we hypothesized that with a pulsed application of RFE, we can lower the apoptotic rate and increase chondrocytes' vitality caused by its continuous use with the concomitant rise in temperature.

## 2. Materials and Methods

**2.1. Study Sample Preparation.** Knees were dissected from freshly slaughtered 6-month-old pigs, and 9 tibia plateaus were utilized for the experiments. The thickness of the porcine chondral layer is similar to that of the human radius cartilage with a mean thickness of 0.9 mm. Areas of 1 cm<sup>2</sup> (4 independent times) were marked, and their middles had 1 mm subchondral holes drilled to fit a temperature sensor (platinum-chip-sensors, Pt 1000, TYP PCA, 1.1505.10 M JUMO, Fulda, Germany). Then, the marked areas were treated with a commercially available emery paper (size P60), using a manual grinding procedure, to simulate an outerbridge grade III osteoarthritis (OA), that was evaluated in a previous experiment [17]. In our previous experiment, the different roughness induced through the emery paper was compared with fresh osteochondral sections taken from hip arthroplasties, where the cartilage defect was graded according to the outerbridge classification. Then, the tibia plateaus were positioned in a custom-made holder, filled with 0.9% NaCl at room temperature and a flow rate of 50 ml/min with a gravity-assisted outflow was applied. Afterwards, the induced OA areas were treated with the bipolar radiofrequency electrode (RFE) (VAPR II 2.3 mm side effect, Depuy Mitek, Westwood, MA, USA) in an ablation mode using a non touch technique. Six different treatment patterns were applied as depicted in Figure 1.

The main treatment patterns evaluated were continuous versus pulsed mode. Half of the designated areas were treated once and the other half twice, as the whole procedure was carried out manually. Furthermore, in the pulsed mode, RFE activation was 1 second followed by a 1-second pause (Figure 1) or 2 seconds followed by a 2-second pause (Figure 1). The temperature was recorded simultaneously via the inserted sensor. The time needed for the different treatment groups is depicted in Figure 2.

**2.2. Live/Dead and Caspase 3/7 Analyses.** Directly after the treatment with RFE, the tibia plateaus were processed for live/dead staining and active caspase 3/7 detection and imaged using a confocal laser scanning microscope (CLSM,

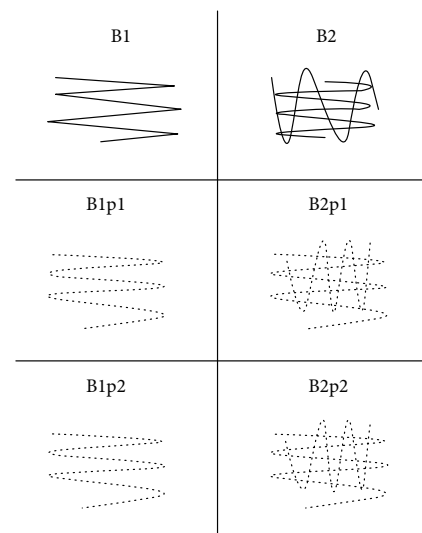


FIGURE 1: RFE treatment patterns used on chondromalacic cartilage with different treatment patterns: B1 = continuous treatment, 1 pass; B2 = continuous treatment, 2 passes; B1p1 = pulsed Treatment 1 second, 1 pass; B1p2 = pulsed Treatment 1 second, 2 passes; B2p1 = pulsed Treatment 2 seconds, 1 pass; and B2p2 = pulsed Treatment 2 seconds, 2 passes.

Nikon Eclipse E600, Kawasaki, Japan). A diamond waver blade (Bühler Säge) was used to cut 1.5 mm thin osteochondral sections for the staining procedures, and a bigger block was utilized for CLSM. For the live/dead staining, one section was incubated with 1.0 ml of phosphate-buffered saline (PBS) containing 2  $\mu$ m calcein-acetoxymethylester and 4  $\mu$ m ethidium homodimer-1 (EthD-1) for 30 minutes at room temperature. The specimens were mounted on the CLSM stage and evaluated at 4x magnification. The photomicrographs were then implemented for quantitate analysis by counting live or dead and caspase 3/7-positive cells with ImageJ software.

For detection of cell apoptosis by caspase (Cas) 3/7 analysis, osteochondral sections were incubated overnight in a cell culture incubator with 4  $\mu$ m Cas 3/7 green detection reagent (Molecular Probes, Thermofisher, Dreieich, Germany) diluted in DMEM low-glucose supplemented (Gibco, Thermofisher) with 10% Fetal Calf Serum (FCS) (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany). Afterwards, specimens were rinsed with PBS and imaged as described above.

**2.3. Quantitative Topographical CLSM Analysis.** CLSM was used for quantitative analysis of cartilage surface roughness. The tibia plateau explants from the treated joint surfaces (consisting of cartilage with underlying bone tissue) with dimensions of approximately 1 cm<sup>2</sup> area and 3 mm thickness were fixed overnight in a 4% formaldehyde solution in 0.1 M phosphate buffer further supplemented with 15% saturated picric acid solution and 0.1% Triton X-100. Following three times washing with PBS, the specimens were immersed in a 2% aqueous solution of tannic acid overnight



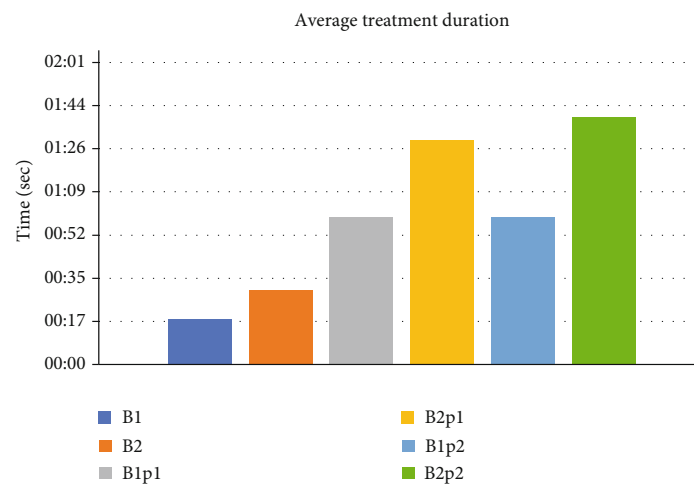


FIGURE 2: Average treatment duration (in seconds) for each RFE pattern.

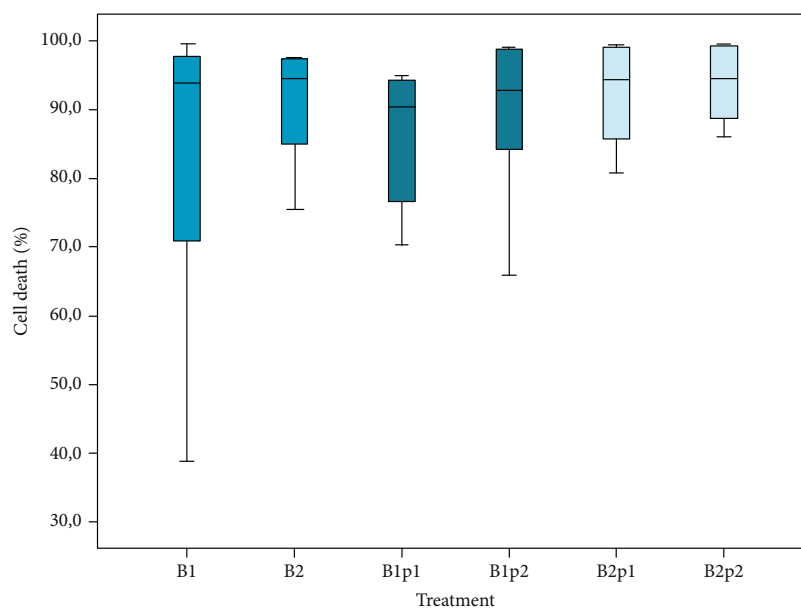


FIGURE 3: Rate of chondrocyte death with respect to RFE treatment pattern. Data is expressed as a percentage of dead cells to the total cell number. Box plot representing median  $\pm$  I.Q.R. of  $n = 6$ .

and subsequently rinsed 6 hours with several changes of  $H_2O$  followed by an overnight impregnation with 4%  $AgNO_3$  dissolved in  $H_2O$ . The silver-stained specimens were rinsed and dehydrated in ascending concentrations of acetone, followed by substitution with 100% tert-butanol. Finally, specimens were placed in small aluminum dishes, frozen in liquid nitrogen, and vacuum-dried.

The deeply black color of the cartilage surface achieved by this technique is excellent for follow-up CLSM imaging. First, qualitative images of the surfaces were acquired. Second, for quantitative characterization of the surfaces, various roughness parameters were measured using the Olympus

LEXTEL OLS 4000 3D CLSM (Olympus, Hamburg, Germany). The surface roughness was expressed by the Root-Mean-Square parameter ( $S_q$ ). The region of interest of each image was set to  $1281 \mu m \times 1279 \mu m$  with 216x magnification and laser intensity of 50%. Six areas of  $4 mm^2$  per sample were marked under light microscopy. If the measurement generated  $S_q > 35 \mu m$ , a different second angle was measured. If  $S_q$  was  $> 40$ , 4 different angles were measured; margins of each treated section served as a control for that section. Repeated measurements at different locations for each specimen were undertaken to establish statistical inference. In total, 46 areas per pattern were evaluated.

TABLE 1: Table showing the relationship between temperature and cell death rate with respect to the treatment pattern.

Treatment pattern	Max temp (mean value)	Cell death (%)	Treatment time in sec. (mean value)	Temperature in °C (mean value)
B1	34.1	93.9%	00:18	28.0
B2	40.8	94.5%	00:30	31.2
B1p1	34.4	90.4%	00:59	29.4
B2p1	34.2	92.9%	00:59	30.1
B1p2	28.7	94.3%	01:30	26.8
B2p2	31.7	94.6%	01:39	28.4
Emery treated only	0	25.0%	0	0

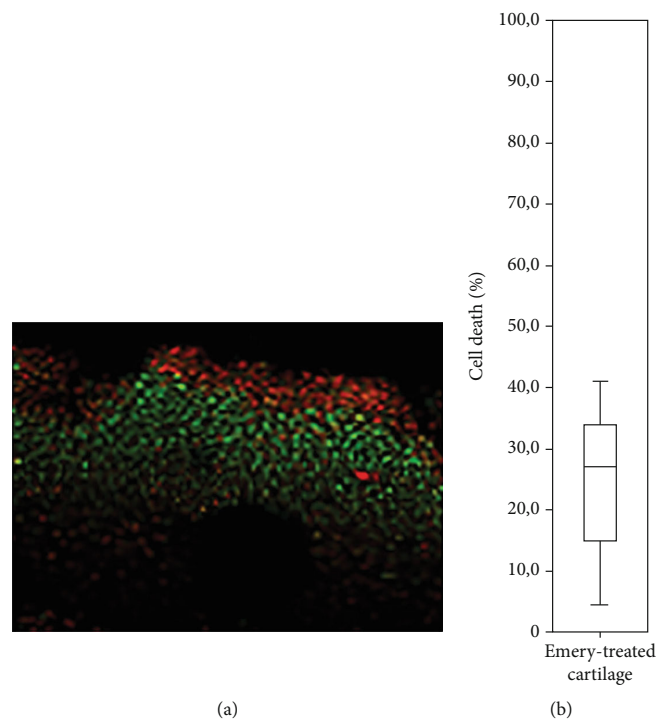


FIGURE 4: (a) Representative photomicrograph of live/dead stained articular cartilage treated with emery paper showing that cell death occurs in the superficial layer of cartilage. (b) Quantification of cell death rate in emery-treated cartilage samples. Box plot representing median  $\pm$  I.Q.R. of  $n = 6$ .

**2.4. Statistics.** Statistical analysis was performed using IBM SPSS Statistics 24.0 software for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). The roughness data was normally distributed (Kolmogorov-Smirnov Test) and a one-way ANOVA test was conducted. The Least Significance Difference Test was chosen as a post hoc test, to explore the difference between the treatment groups. Since the underlying data of the live/dead staining were not normally distributed, a nonparametric test was applied (Kruskal-Wallis Test). Values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant.

### 3. Results

**3.1. Evaluation of Chondrocyte Survival.** The cell death rate for each group is shown in Figure 3 and Table 1. For contin-

uous modes, B1 and B2, the median cell death in the cartilage layer was 93.9% and 94.5%, respectively. The lowest value was found for the B1p1 group with a median of 90.4% and followed by the B2p1 group with 92.9%. The highest death toll was in the B1p2 with 94.3% and in the B2p2 with 94.6%. Analysis of only emery-treated cartilage samples shows that cell death is primarily restricted to the superficial layer of cartilage with minimal cell death in the deep zones of the tissue. Quantitative analysis of this group demonstrates that there is a substantially lower cell death rate (mean: 25%) compared to samples subjected to RFE (Figure 4 and Table 1).

Statistically, there were no significant differences between the treatments ( $p = 0.744$ ), although the death rate was higher, when two RFE passes were applied. These results

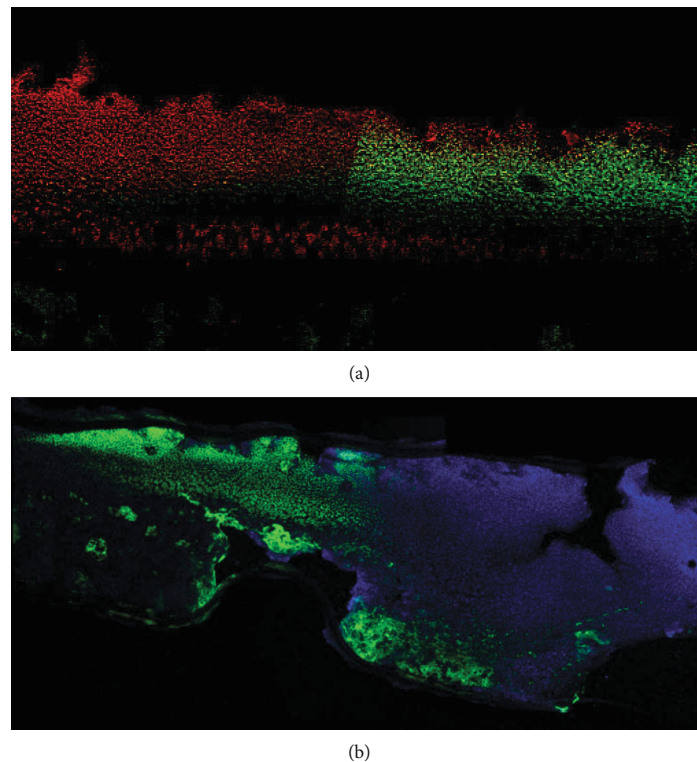


FIGURE 5: Photomicrographs of live/dead staining within the cartilage and underlying subchondral bone describing the (a) thermal penetration produced during treatment with B2 pattern and resultant cell viability with green dots indicating live chondrocytes, whilst red dots are dead chondrocytes. Representative image of caspase staining at (b) 24 hours post RFE treatment with blue dots showing nuclei of live chondrocytes whilst green dots labelled caspase-positive dead chondrocytes. Microscope magnification: 10x.

were further validated by the apoptosis-specific caspase staining (Figure 5). In sum, our results demonstrated that all implemented RFE patterns and application modes caused profound cell death in the cartilage layer.

**3.2. Quantitative Topographical Analysis.** The surface roughness was expressed through the Root-Mean-Square Sq, which for native healthy cartilage is  $Sq = 3.8 \pm 1.1 \mu m$  ( $n = 24$ ). Untreated osteoarthritic cartilage outerbridge grade III had a  $Sq = 42.6 \pm 7.2 \mu m$  ( $n = 27$ ). The continuous treatment with one pass B1 showed a reduction of the roughness to  $Sq = 33.1 \pm 8.5 \mu m$  ( $n = 19$ ) and with a second pass B2 to  $Sq = 31.3 \pm 7.4 \mu m$  ( $n = 21$ ). The pulsed treatment B1p1 pattern with a 1-second pause and 1 pass reached a  $Sq = 34.1 \pm 7.9 \mu m$  ( $n = 18$ ) and on the second pass B1p2  $Sq = 28.0 \pm 8.1 \mu m$  ( $n = 15$ ). A similar roughness was reached with a pulsed treatment pattern with a 2-second pause in the first pass B2p1 with  $Sq = 30.2 \pm 8.6 \mu m$  ( $n = 28$ ), and the best result had this pattern on the second pass, B2p2  $Sq = 27.3 \pm 4.9 \mu m$  ( $n = 26$ ). We could find in all RFE treatment groups a statistically significant reduction of the cartilage surface roughness compared to the untreated osteoarthritic cartilage ( $p < 0.001$ ). There was no statistical difference between the treatment patterns. Altogether, based on the Sq parameter, the best result was the B2p2 RFE-pulsed

pattern with a 2-second pause and 2 passes. Figure 6 shows representative three-dimensional images obtained by CSLM for native, OA, B1, and B2 treatment groups.

**3.3. Time and Temperature Relationship.** Regarding time-dependent temperature changes, for the B1 pattern, the maximum temperature was  $34.1^\circ C$  ( $n = 6$ ) within a mean treatment time of 18 seconds. In the B2 group, an increased maximum temperature of  $40.8^\circ C$  ( $n = 6$ ) was detected at an interval of 30 seconds.

Figure 7 shows that for both continuous RFE modes, a steep rise in the temperature, when compared to a steadier increase with a plateau-like phase for the RFE-pulsed mode. For this mode, the maximum temperature in the B1p1 group was  $34.4^\circ C$  ( $n = 6$ ), B1p2  $28.7^\circ C$  ( $n = 6$ ), B2p1  $34.2^\circ C$  ( $n = 6$ ), and B2p2  $31.7^\circ C$  ( $n = 6$ ) (Table 1). In sum, apart from the B2 group, the maximum temperatures reached for the other groups were reasonable, suggesting that another parameter, independent of temperature, may trigger the increased cell death observed. It can be speculated that the cell death was not triggered by the produced heat but rather by the melting of the cartilage matrix and cells embedded within its structure. However, the exact mechanisms responsible for the cell death are to be clarified in future experiments.

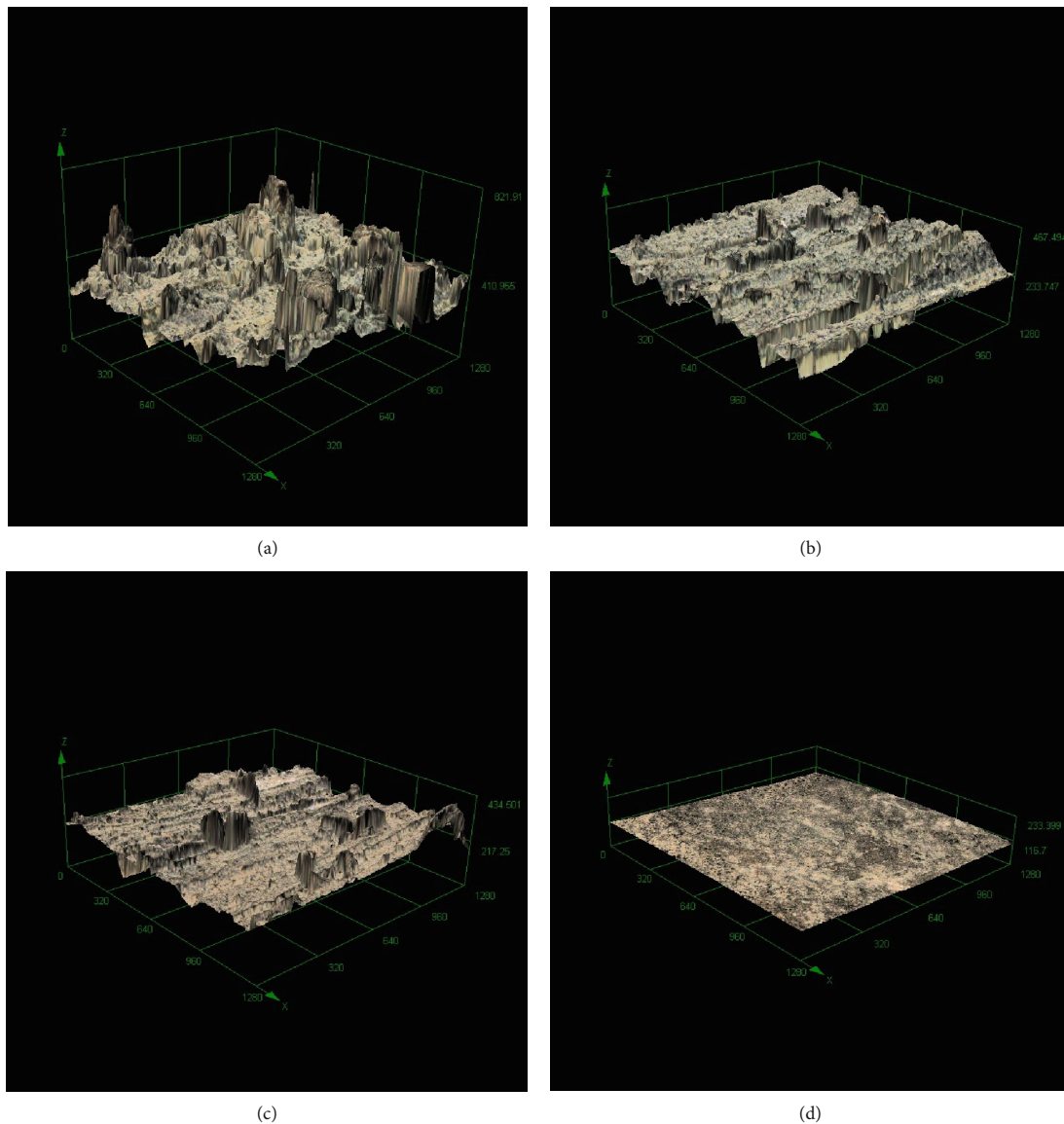


FIGURE 6: Three-dimensional CLMS images of (a) chondromalacic cartilage generated by emery paper ( $S_q = 58.4 \mu\text{m}$ ); (b) after continuous treatment B1, one pass ( $S_q = 37.7 \mu\text{m}$ ); (c) continuous treatment B2, two passes ( $S_q = 32.0 \mu\text{m}$ ); and (d) native cartilage ( $S_q = 2.7 \mu\text{m}$ ).  $S_q$  means surface roughness.

#### 4. Discussion

In our study, we investigated the smoothing effect of the cartilage surface with a bipolar RFE device. With quantitative topographical analysis, we found that the smoothing effect was dependent on the number of RFE passes over the cartilage surface. However, with increased smoothing, an augmentation in chondrocyte death up to 95% was detected.

In a previous study that evaluated different RFE devices, different grades of smoothness were achieved for the surface of the cartilage with variable chondrocyte cell death [3]. In another study, just 30 seconds of treatment was sufficient to

achieve a smooth cartilage surface with cell death restricted to the subchondral layer. Here, a customized holder was used with very standardized RFE passes (weight, velocity). The authors applied one RFE pass of 5 seconds and already after 3 consecutive passes, a melting of the fibrillated cartilage was detected [13]. In our study, for the manual treatment of a cartilage area of  $1 \text{ cm}^2$ , at least 17 seconds were needed to perform one continuous pattern with one pass (B1 pattern). Macroscopically, a smoothing of the cartilage surface was only visible after a second pass. Furthermore, in our experiments, already after one pass, the melting of the fibrillated cartilage was demonstrated by a decrease in the  $S_q$  value.

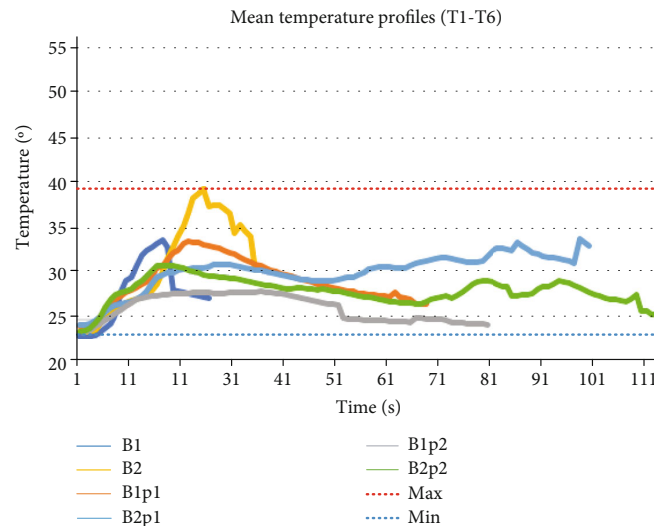


FIGURE 7: Time/temperature curve of the different RFE patterns.

Kosy et al. postulated to move the RFE continuously and that only one pass should be enough to reach surface smoothing but with minimal thermal damage of the cells [18]. In contrast, our findings suggest that the continuous treatment with just one pass already triggers massive cell death (approx. 94%). Interestingly, only the pattern B1p1, had a lesser chondrocyte death than the other ones, although approximately only 10% of the cells in the cartilage layer survived. Moreover, our data suggests that the application time has a lesser impact than hypothesized [19], as well as the temperature increase being independent of the treatment pattern. In our experiment, the maximum temperature varied between 28.7 and 40.8 °C, which was measured in the subchondral bone in the middle of the section. It is hypothesized that the temperature affecting the above chondrocytes must be higher as shown in further experiments [4].

We also noted a tendency for the pulsed mode to have a lesser negative effect onto the chondrocytes. One explanation for the discrepancy is that Lu et al. conducted their experiment on osteochondral samples from knee replacements, where the cartilage layer has a thickness of 2-3 mm [13]. Our experiments were conducted on a thin cartilage layer similar to the small joint surface of the human wrist. We suggest that, in this case, the resident chondrocytes have a lower amount of surrounding territorial and interterritorial matrices that can protect them during RFE treatment. Thus, this approach is unsuitable for the regeneration of small joints.

In our study, the smoothing of the surface was also independent of the treatment pattern. However, a tendency towards roughness decreases after two RFE passes was detected. Still, the reached smoothing was far behind the values of native healthy cartilage. In sum, our findings are in line with two studies [13, 20] where following smoothing of the cartilage surface, a profound cell death was observed. Altogether, the postulation that RFE is a safe method for cartilage treatment [6] both in this study and by others means

that this technique should be used with precautions for joints with a thin cartilage layer.

**4.1. Limitation.** One drawback of our study is that we tested only one bipolar RFE device. It has been suggested that there is a difference between device manufacturers, particularly in the metal used for ligation of the electrode tip and the insulation materials of the electrode wand that enable better chondrocyte survival [7, 21]. Furthermore, it has been shown that chondromalacic cartilage is more sensitive to higher temperatures than intact, healthy cartilage [22]. However, in our application modes, apart from the B2 group, the maximum temperatures reached for the other groups were reasonable, suggesting that a factor independent of the temperature could trigger the observed massive cell death.

## 5. Conclusion

All in all, there are multiple factors, which should be taken into account, when smoothing diseased cartilage with RFE in a clinical setting. In our study, based on the survival rate and apoptosis monitoring, a recommendation to use RFE for cartilage therapy cannot be given. We suggest that the baseline state of the cartilage subjected to treatment, RFE application mode, and duration, as well as the quality of the implemented RFE device, are critical but difficult to control in RFE regenerative therapy of small joints. Further research efforts are needed to standardize and control the technique, as well as to identify strategies to minimize the cell death rate to acceptable levels.

## Data Availability

Most of the data used to support the findings of this study are included in the article, further data's are available from the corresponding author upon request.



## Conflicts of Interest

All authors declare that there are no competing interests regarding the publication of this paper.

## References

- [1] H. P. Benton, T. C. Cheng, and M. H. MacDonald, "Use of adverse conditions to stimulate a cellular stress response by equine articular chondrocytes," *American Journal of Veterinary Research*, vol. 57, no. 6, pp. 860–865, 1996.
- [2] L. D. Kaplan, J. M. Ernsthausen, J. P. Bradley, F. H. Fu, and D. L. Farkas, "The thermal field of radiofrequency probes at chondroplasty settings," *Arthroscopy*, vol. 19, no. 6, pp. 632–640, 2003.
- [3] L. Yan, R. B. Edwards III, B. J. Cole, and M. D. Markel, "Thermal chondroplasty with radiofrequency energy," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 29, no. 1, pp. 42–49, 2001.
- [4] R. B. Edwards III, Y. Lu, and M. D. Markel, "The basic science of thermally assisted chondroplasty," *Clinics in Sports Medicine*, vol. 21, no. 4, pp. 619–647, 2002.
- [5] M. Huber, C. Eder, M. Mueller et al., "Temperature profile of radiofrequency probe application in wrist arthroscopy: monopolar versus bipolar," *Arthroscopy*, vol. 29, no. 4, pp. 645–652, 2013.
- [6] L. Kaplan, J. W. Uribe, H. Sasken, and G. Markarian, "The acute effects of radiofrequency energy in articular cartilage: an in vitro study," *Arthroscopy*, vol. 16, no. 1, pp. 2–5, 2000.
- [7] S. Caffey, E. McPherson, B. Moore, T. Hedman, and C. T. Vangsness, "Effects of radiofrequency energy on human articular Cartilage," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 33, no. 7, pp. 1035–1039, 2005.
- [8] Y. Lu, R. B. Edwards, S. Nho, B. J. Cole, and M. D. Markel, "Lavage solution temperature influences depth of chondrocyte death and surface contouring during thermal chondroplasty with temperature-controlled monopolar radiofrequency energy," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 30, no. 5, pp. 667–673, 2002.
- [9] A. S. Turner, J. W. Tippet, B. E. Powers, R. D. Dewell, and C. H. Mallinckrodt, "Radiofrequency (electrosurgical) ablation of articular cartilage: a study in sheep," *Arthroscopy*, vol. 14, no. 6, pp. 585–591, 1998.
- [10] J. R. Voss, Y. Lu, R. B. Edwards III, J. J. Bogdanske, and M. D. Markel, "Effects of thermal energy on chondrocyte viability," *American Journal of Veterinary Research*, vol. 67, no. 10, pp. 1708–1712, 2006.
- [11] K. Yasura, Y. Nakagawa, M. Kobayashi, H. Kuroki, and T. Nakamura, "Mechanical and biochemical effect of monopolar radiofrequency energy on human articular cartilage: an in vitro study," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 34, no. 8, pp. 1322–1327, 2006.
- [12] R. B. Edwards, Y. Lu, B. J. Cole, P. Muir, and M. D. Markel, "Comparison of radiofrequency treatment and mechanical debridement of fibrillated cartilage in an equine model," *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, vol. 21, no. 1, pp. 41–48, 2008.
- [13] Y. Lu, R. B. Edwards III, S. Nho, J. P. Heiner, B. J. Cole, and M. D. Markel, "Thermal chondroplasty with bipolar and monopolar radiofrequency energy: effect of treatment time on chondrocyte death and surface contouring," *Arthroscopy*, vol. 18, no. 7, pp. 779–788, 2002.
- [14] F. M. Hall and G. Wyshak, "Thickness of articular cartilage in the normal knee," *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 62, no. 3, pp. 408–413, 1980.
- [15] H.-M. Schmidt and U. Lanz, *Surgical Anatomy of the Hand*, Thieme, 1st edition, 2004.
- [16] T. Steven, Z. Peng, C. Yuan, and X. Yan, *Quantitative Surface Characterisation Using Laser Scanning Confocal Microscopy*, intechopen, 2012, <http://cdn.intechweb.org/pdfs/15797.pdf>.
- [17] B. Striegl, R. Kujat, and S. Dendorfer, "Quantitative analysis of cartilage surface by confocal laser scanning microscopy," in *Conference: 48th DGBMT Annual Conference, Volume: 59*, Hannover, October 2014.
- [18] J. D. Kosy, P. J. Schranz, A. D. Toms, K. S. Eyres, and V. I. Mandalia, "The use of radiofrequency energy for arthroscopic chondroplasty in the knee," *Arthroscopy*, vol. 27, no. 5, pp. 695–703, 2011.
- [19] M. Huber, C. Eder, M. Loibl et al., "RFE based chondroplasty in wrist arthroscopy indicates high risk for chondrocytes especially for the bipolar application," *BMC Musculoskeletal Disorders*, vol. 16, no. 1, p. 6, 2015.
- [20] R. B. Edwards III, Y. Lu, S. Nho, B. J. Cole, and M. D. Markel, "Thermal chondroplasty of chondromalacic human cartilage: an ex vivo comparison of bipolar and monopolar radiofrequency devices," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 30, no. 1, pp. 90–97, 2002.
- [21] M. L. Meyer, Y. Lu, and M. D. Markel, "Effects of radiofrequency energy on human chondromalacic cartilage: an assessment of insulation material properties," *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 52, no. 4, pp. 702–710, 2005.
- [22] L. D. Kaplan, D. Ionescu, J. M. Ernsthausen, J. P. Bradley, F. H. Fu, and D. L. Farkas, "Temperature requirements for altering the morphology of osteoarthritic and nonarthritic articular cartilage: in vitro thermal alteration of articular cartilage," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 32, no. 3, pp. 688–692, 2004.

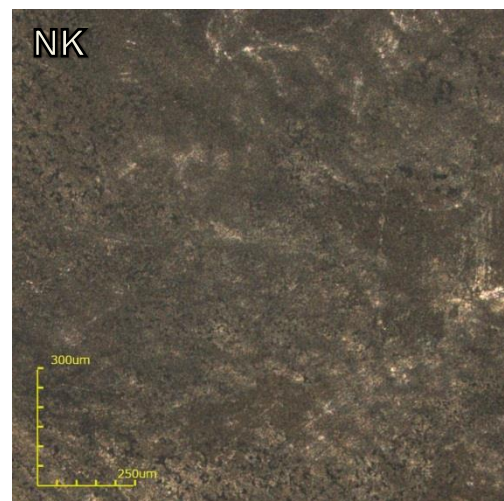
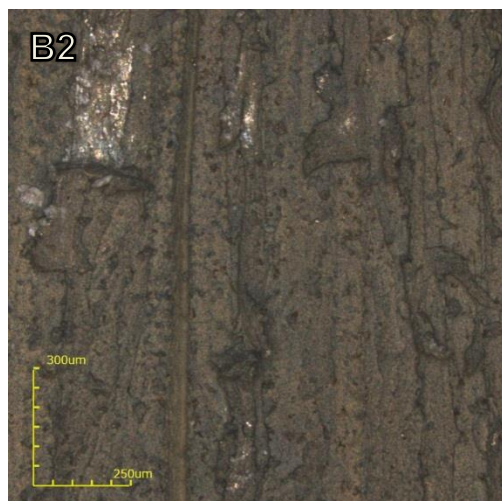
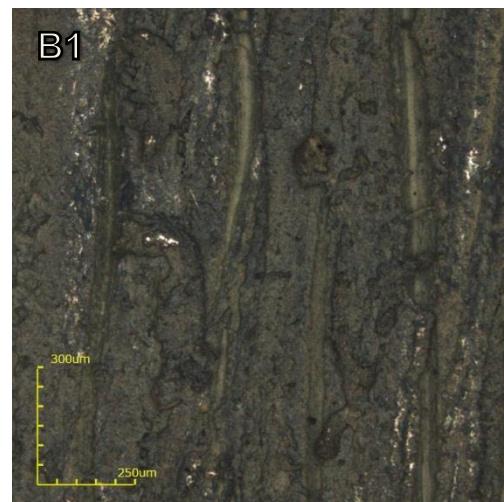
## 9. Anhang

### 9.1 CLSM – Aufnahmen

Im Folgenden werden die in 5.1.3 erwähnten Aufnahmen, welche mit dem CLSM aufgenommen wurden, dargestellt. In den Abbildungen 13 und 14 sind zweidimensionale Aufnahmen zu sehen, in Abbildung 15 - 18 dreidimensionale. Es werden jeweils Farbaufnahmen sowie Aufnahmen mit Höhenprofil abgebildet.

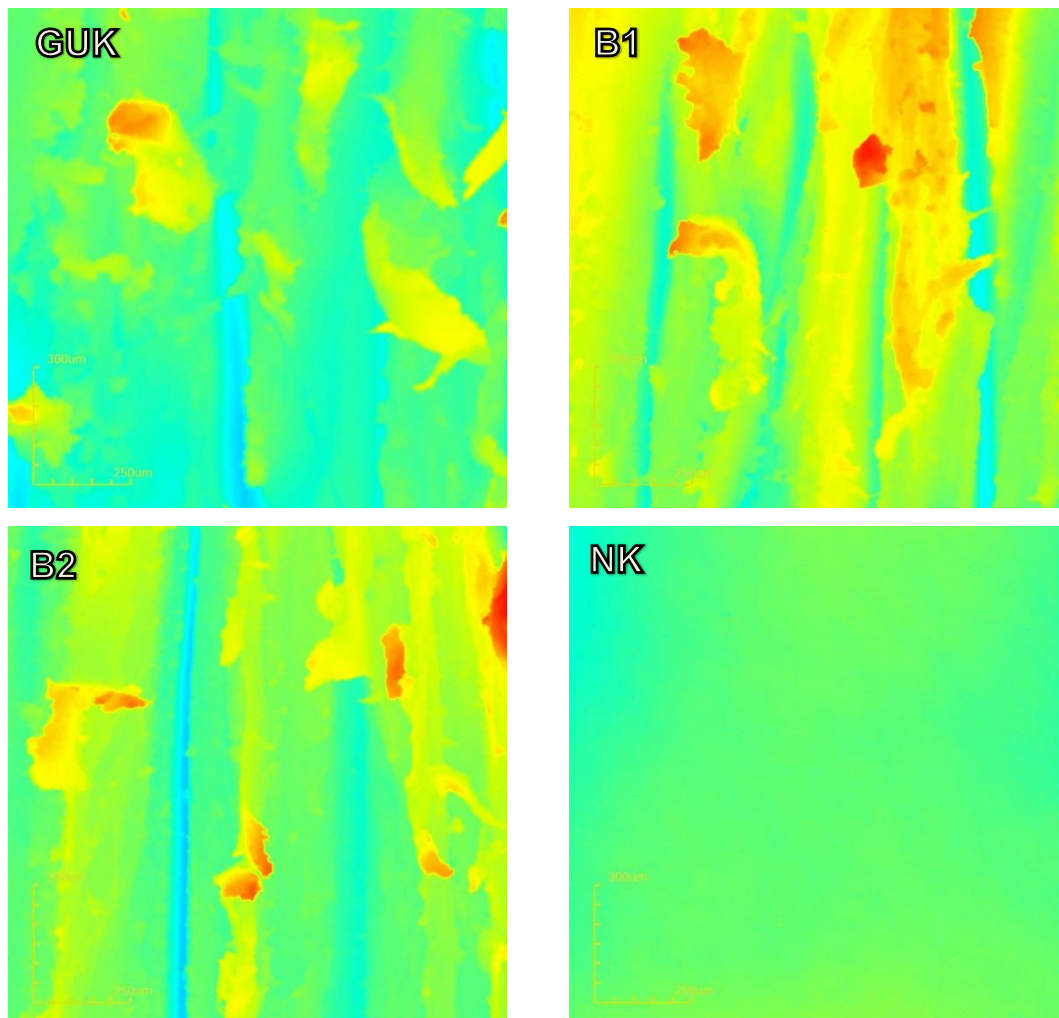
Es wurden vier verschiedene Flächen ausgewählt und der entsprechende Rauheitswert ( $S_q$  [ $\mu\text{m}$ ]) berechnet:

<b>GUK:</b> Geschliffener, unbehandelter Knorpel:	$S_q = 58.4 \mu\text{m}$
<b>B1:</b> Einmalig kontinuierlich behandelter Knorpel:	$S_q = 37.7 \mu\text{m}$
<b>B2:</b> Zweimalig kontinuierlich behandelter Knorpel:	$S_q = 32.0 \mu\text{m}$
<b>NK:</b> Nativer Knorpel:	$S_q = 2.7 \mu\text{m}$



**Abbildung 13: Zweidimensionale Farbaufnahme der Knorpeloberflächen (GUK, B1, B2, NK) (216fache Vergrößerung, CLSM)**





**Abbildung 14: Zweidimensionale Aufnahme des Höhenprofils der Knorpeloberflächen (GUK, B1, B2, NK) (216fache Vergrößerung, CLSM; Z-Achse mit Farbskala in dreidimensionalen Abbildungen (15 – 18) abgebildet)**

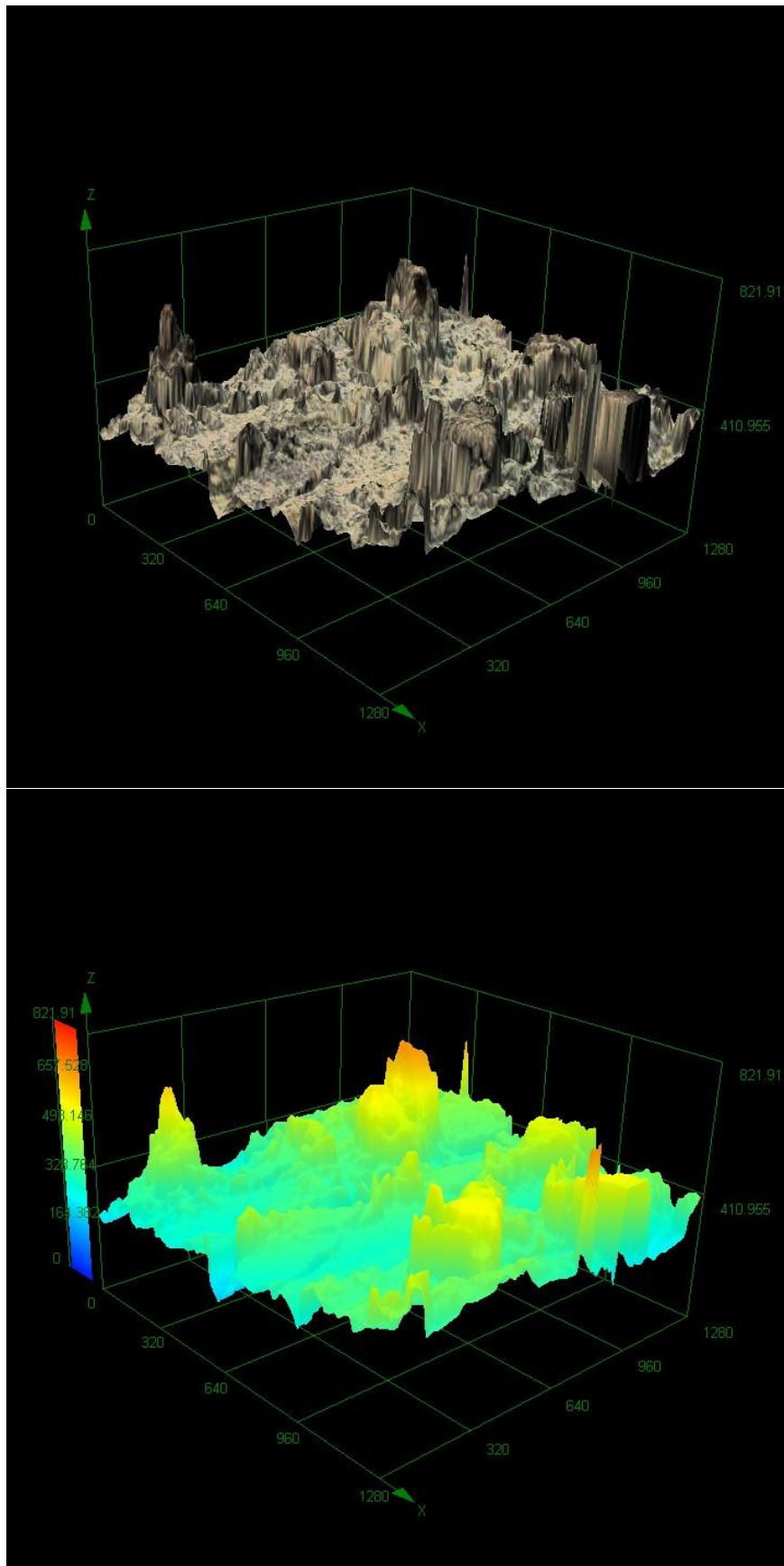


Abbildung 15: GUK in dreidimensionaler Darstellung, oben: Farbbild, unten: Höhenprofil ( $S_q = 58.4 \mu\text{m}$ )

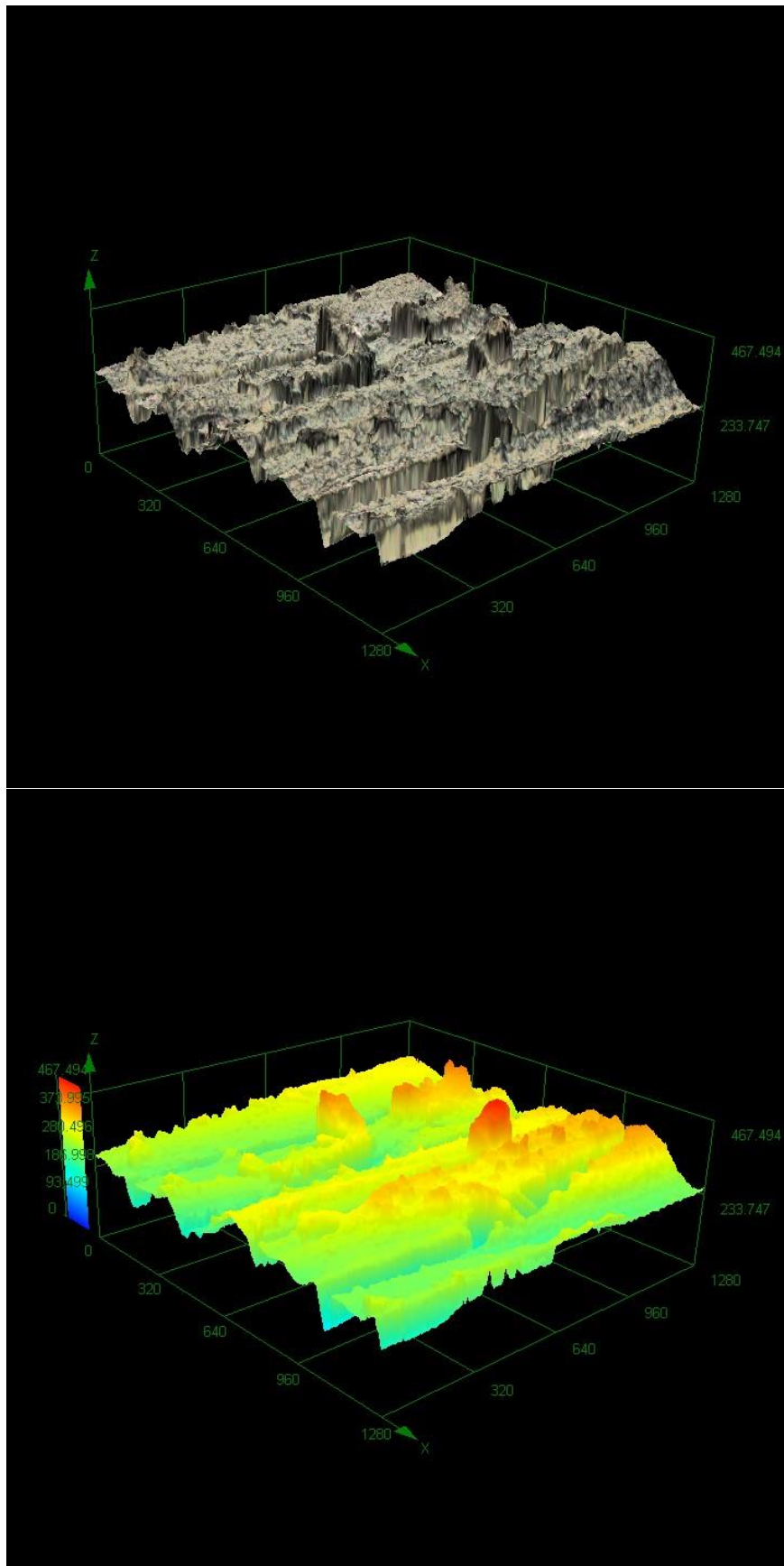


Abbildung 16: B1 in dreidimensionaler Darstellung, oben: Farbbild, unten: Höhenprofil ( $S_q = 37.7 \mu\text{m}$ )

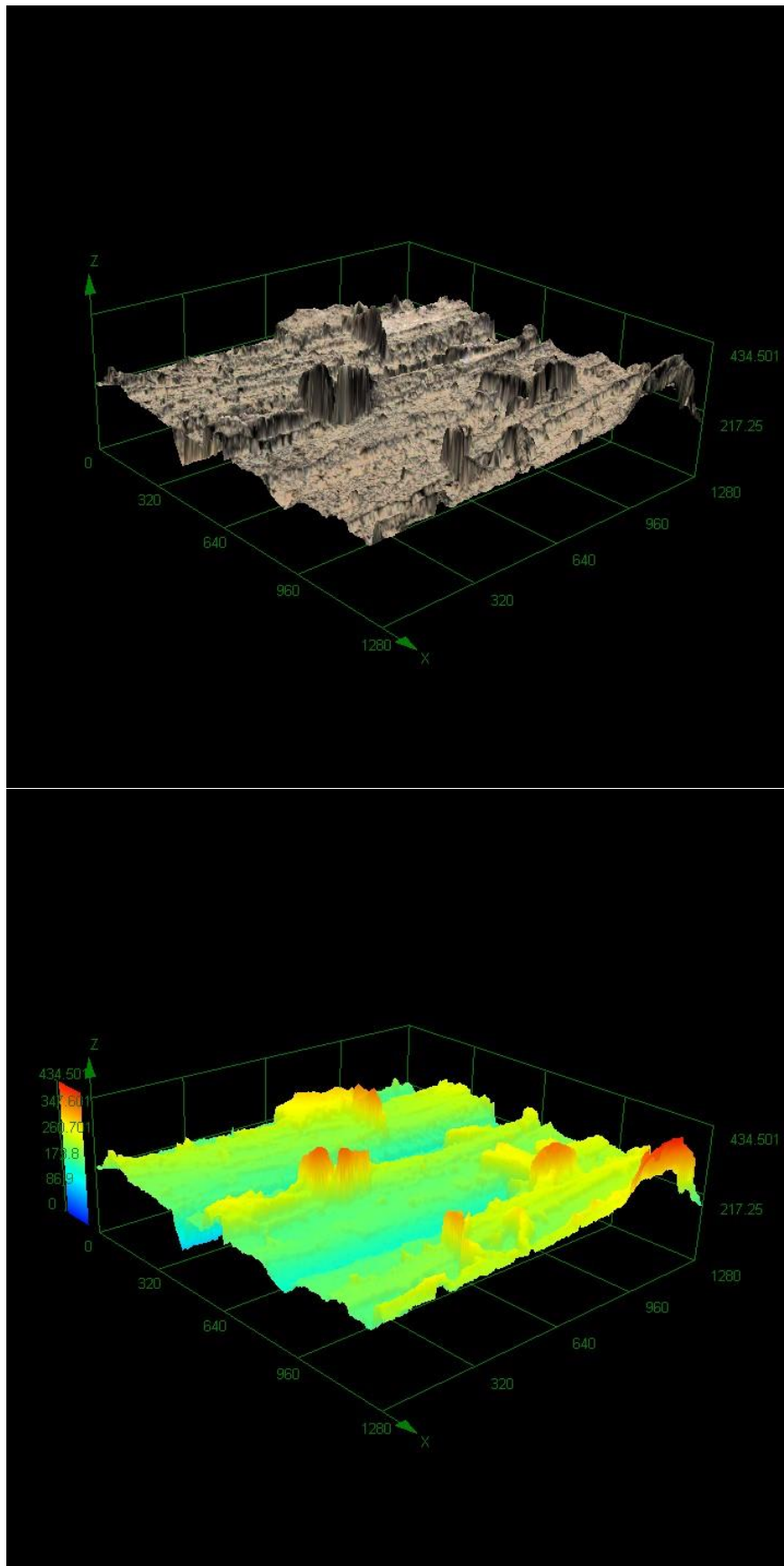


Abbildung 17: B2 in dreidimensionaler Darstellung, oben: Farbbild, unten: Höhenprofil ( $S_q = 32.0 \mu\text{m}$ )

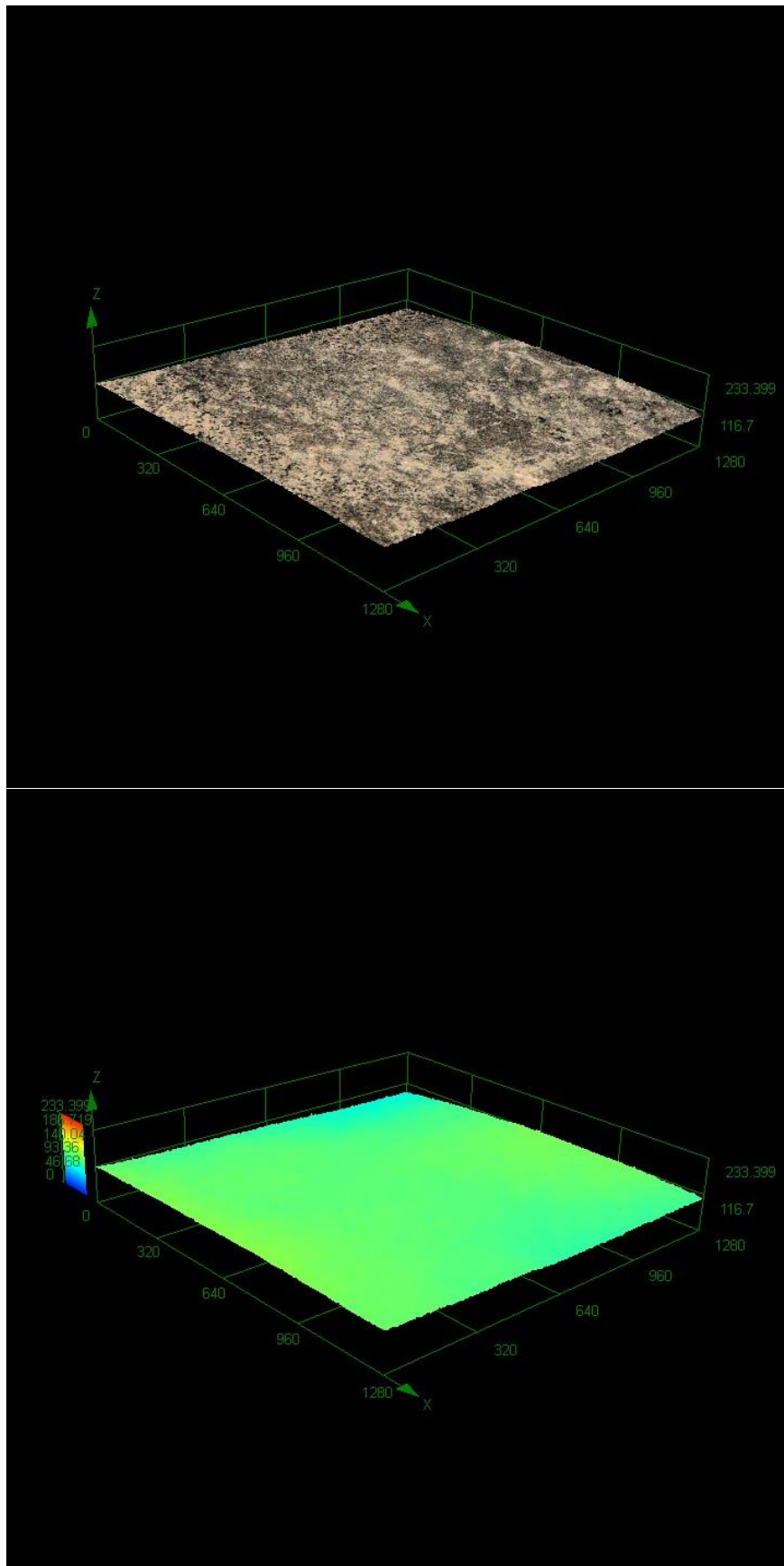


Abbildung 18: NK in dreidimensionaler Darstellung, oben: Farbbild, unten: Höhenprofil ( $S_q = 2.7 \mu\text{m}$ )

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1:** Skizze der Knorpelschichten: Lamina splendens, Tangentialfaserschicht (I), Transitionalzone (II), Radiärzone (III), Tidemark, Mineralisierter Knorpel (IV), dazwischen Knorpelzellen (schwarze Punkte) und Chondrone (grau); oben: Knorpeloberfläche, unten: Subchondraler Knochen; Eigene Darstellung in Anlehnung an: Im Internet: Aufbau und Relevanz des Knorpels und der extrazellulären Matrix. [research.uni-leipzig.de/schij/wahlfach/kap02.pdf](http://research.uni-leipzig.de/schij/wahlfach/kap02.pdf); Stand: 24.01.2018 ..... **11**

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Anwendung monopolarer RFE (links) und bipolarer RFE (rechts); Hellgrün: Aktivelektrode, Dunkelgrün: Ableitende Elektrode, Blau: behandeltes Gewebe, Rote Pfeile: Stromfluss, Hochfrequenz(HF)-Generator Monopolare RFE: direkter Kontakt der Aktivelektrode zum Gewebe, Stromfluss durch das Gewebe zur Neutralelektrode Bipolare RFE: Abstand der Elektroden zum Gewebe, Behandlung durch erzeugtes Plasmafeld, lokal begrenzter Stromfluss; Eigene Darstellung ..... **18**

**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Behandlungsmuster: B1: Einmalige kontinuierliche bipolare RFE-Behandlung, B2: Zweimalige kontinuierliche bipolare RFE-Behandlung, B1p1: Einmalige gepulste bipolare RFE-Behandlung mit einem Behandlungsintervall von 1 s, B2p1: Zweimalige gepulste bipolare RFE-Behandlung mit einem Behandlungsintervall von 1 s, B1p2: Einmalige gepulste bipolare RFE-Behandlung mit einem Behandlungsintervall von 2 s, B2p2: Zweimalige gepulste bipolare RFE-Behandlung mit einem Behandlungsintervall von 2 s; Eigene Darstellung..... **37**

**Abbildung 4:** links: Aufbau der Sondenspitze des VAPR® II Gerätes, rechts: die im Versuch verwendete 2.3 mm Flügelelektrode, laut Hersteller Minimierung von Kollateralschäden durch den Isolator sowie die Neigung von 45°; Im Internet: Fachinformationen der Firma DePuy Mitek, Inc., MA, USA: Depuy Mitek VAPR® System User Manual. [prod.mitek.depuy.edgesuite.net/IFUsforWebsite/103097.pdf](http://prod.mitek.depuy.edgesuite.net/IFUsforWebsite/103097.pdf); Stand: 03.02.2020 ..... **38**

**Abbildung 5:** Korrelation der gemessenen Sq-Werte verschiedener Osteoarthrosegrade (OA I, OA II, OA III) mit der Rauheit von einer unbehandelten Kontrolle sowie mit Sandpapier verschiedener Körnungen behandeltem Schweineknorpel (P180, P120, P60) anhand von Einzelbeispielen (Dr. Striegl, PD Dr. Huber, Dr. Kujat, Prof. Dendorfer)..... **42**

**Abbildung 6:** Schwankung der Sq-Mittelwerte (MW) und der Standardabweichung in Abhängigkeit von der Rauheit des Knorpels nach Behandlung mit Schleifpapier verschiedener Körnungen (P60,

P120, P180) und deren Messung aus verschiedenen Winkeln (Dr. Striegl, PD Dr. Huber, Dr. Kujat, Prof. Dendorfer) ..... 43

**Abbildung 7:** lichtmikroskopische Aufnahme (x 0.7) einer Knorpelprobe, unten: sechs markierte Flächen im behandelten Bereich des Knorpels, oben: eine markierte Fläche außerhalb des behandelten Bereiches ..... 44

**Abbildung 8:** Skizze: Aufsicht von oben, Anordnung der Präparate bei der Messung der Oberflächenrauheit mittels des CLSM in verschiedenen Winkeln (0 °, 30 °, 60 °, 90 °) (lichtmikroskopische Aufnahme eines unbehandelten geschliffenes Präparates x 0.7) ..... 45

**Abbildung 9:** Histogramm der gemittelten Rauheitswerte der Knorpeloberfläche nach den verschiedenen Behandlungen (B1, B2, B1p1, B2p1, B1p2, B2p2) sowie des GUK und des NK, Behandlungen mit gleichem Behandlungsmuster werden in identischen Farben dargestellt..... 51

**Abbildung 10:** Ausschnitte lichtmikroskopischer Aufnahmen (x 0.7) verschiedener Knorpeloberflächen (links GUK, mittig B2, rechts NK am Rande einer geschliffenen Knorpeloberfläche) ..... 51

**Abbildung 11:** Boxplot zur Veranschaulichung des Untergangs von Knorpelzellen nach den verschiedenen Behandlungsmethoden. Der theoretische Minimalwert beträgt 0.0 %..... 55

**Abbildung 12:** Oben: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Live/Dead-Färbung eines Knorpelgewebes (x4) oben Knorpeloberfläche, unten subchondraler Knochen links: rot fluoreszierender Farbstoff in Zellkernen abgestorbener Knorpelzellen nach B2 rechts: grün fluoreszierender Farbstoff im Cytoplasma lebender Knorpelzellen im unbehandelten Randbereich  
Unten: Mittels Photoshop zusammengeführtes Bild mehrerer fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen (x4) einer Caspase-Färbung des Knorpelgewebes 24h nach B2p2, oben Knorpeloberfläche, unten subchondraler Knochen links: grün fluoreszierender Farbstoff im Zellkern apoptotischer Knorpelzellen im behandelten Bereich, darunterliegend Knochengewebe rechts: blau fluoreszierender Farbstoff in nicht von Apoptose betroffenen Knorpelzellen im unbehandelten Randbereich. .... 56

**Abbildung 13:** Zweidimensionale Farbaufnahme der Knorpeloberflächen (GUK, B1, B2, NK) (216fache Vergrößerung, CLSM) ..... 81



**Abbildung 14:** Zweidimensionale Aufnahme des Höhenprofils der Knorpeloberflächen (GUK, B1, B2, NK) (216fache Vergrößerung, CLSM; Z-Achse mit Farbskala in dreidimensionalen Abbildungen (15 – 18) abgebildet)..... **82**

**Abbildung 15:** GUK in dreidimensionaler Darstellung, oben: Farbbild, unten: Höhenprofil ( $S_q = 58.4 \mu\text{m}$ ) ..... **83**

**Abbildung 16:** B1 in dreidimensionaler Darstellung, oben: Farbbild, unten: Höhenprofil ( $S_q = 37.7 \mu\text{m}$ ) ..... **84**

**Abbildung 17:** B2 in dreidimensionaler Darstellung, oben: Farbbild, unten: Höhenprofil ( $S_q = 32.0 \mu\text{m}$ ) ..... **85**

**Abbildung 18:** NK in dreidimensionaler Darstellung, oben: Farbbild, unten: Höhenprofil ( $S_q = 2.7 \mu\text{m}$ ) ..... **86**

### 9.3 Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** Outerbridge Klassifikation von Knorpeldefekten, erweitert durch die Klassifikation der International Cartilage Research Society (ICRS), Osteoarthrose Grad I - IV [24 – 27].....**5**

**Tabelle 2:** Stichprobengrößen (n) sowie Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), Minima (Min) und Maxima (Max) der Rauheitswerte in  $\mu\text{m}$  der verschiedenen Behandlungsgruppen; Referenzwerte: GUK (n = 27):  $S_q = 42.6 \pm 7.2 \mu\text{m}$ ; NK (n = 24):  $S_q = 3.8 \pm 1.1 \mu\text{m}$ .....**50**



## 10. Literatur

- 1 Arokoski JP, Jurvelin JS, Väättäin U, Helminen HJ. Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports* 2000; 10 (4): 186–198; DOI: 10.1034/j.1600-0838.2000.010004186.x
- 2 Fox AJS, Bedi A, Rodeo SA. The basic science of articular cartilage: Structure, composition, and function. *Sports Health* 2009; 1 (6): 461–468; DOI: 10.1177/1941738109350438
- 3 Welsch U, Deller T. 7.1 Gelenke. In: *Lehrbuch Histologie*. 3 Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2010: 253-257
- 4 Mandelbaum BR, Browne JE, Fu F, Micheli L, Mosely JB, Erggelet C, Minas T, Peterson L. Articular cartilage lesions of the knee. *Am J Sports Med* 1998; 26 (6): 853–861; DOI: 10.1177/03635465980260062201
- 5 Buckwalter JA, Martin JA. Osteoarthritis. *Adv Drug Deliv Rev* 2006; 58 (2): 150–167; DOI: 10.1016/j.addr.2006.01.006
- 6 Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ. Articular cartilage and osteoarthritis. *Instr Course Lect* 2005; 54: 465–480
- 7 Buckwalter JA, Martin JA. Sports and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16 (5): 634–639; DOI: 10.1097/01.bor.0000132647.55056.a9
- 8 CDC National Center for Health Statistics. NCHS Data on Arthritis (October 2014). Im Internet: [www.arthritis.org/Brand/assets/CDC-Fact-Sheet-Arthritis-Oct2014.pdf](http://www.arthritis.org/Brand/assets/CDC-Fact-Sheet-Arthritis-Oct2014.pdf); Stand: 24.01.2019
- 9 Kalunian KC. Risk factors for and possible causes of osteoarthritis - UpToDate (03.10.2017). Im Internet: [www.uptodate.com/contents/risk-factors-for-and-possible-causes-of-osteoarthritis/print?source=search\\_result&search=Osteoarthritis%20prevalence&selectedTitle=1~150](http://www.uptodate.com/contents/risk-factors-for-and-possible-causes-of-osteoarthritis/print?source=search_result&search=Osteoarthritis%20prevalence&selectedTitle=1~150); Stand: 24.01.2019
- 10 Hartz AJ, Fischer ME, Bril G, Kelber S, Rupley D, Oken B, Rimm AA. The association of obesity with joint pain and osteoarthritis in the HANES data. *J Chronic Dis* 1986; 39 (4): 311–319; DOI: 10.1016/0021-9681(86)90053-6
- 11 Becher C, Landgraeber S, Fickert S, Niemeyer P, Angele P. Behandlung von Knorpelschäden an Knie, Sprunggelenk und Hüfte. Aktuelle Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration. *OUP* 2018; 7 (12): 580–587; DOI: 10.3238/oup.2018.0580
- 12 Welsch U, Deller T. 3.2.11 Knorpelgewebe. In: *Lehrbuch Histologie*. 3 Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer; 2010: 105-108
- 13 Wu JP, Kirk TB, Zheng MH. Study of the collagen structure in the superficial zone and physiological state of articular cartilage using a 3D confocal imaging technique. *J Orthop Surg Res* 2008; 3: 29; DOI: 10.1186/1749-799X-3-29
- 14 Grenier S, Bhargava MM, Torzilli PA. An in vitro model for the pathological degradation of articular cartilage in osteoarthritis. *J Biomech* 2014; 47 (3): 645–652; DOI: 10.1016/j.jbiomech.2013.11.050

- 15 O'Driscoll SW. The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 1998; 80 (12): 1795–1812
- 16 Edwards RB, Lu Y, Markel MD. The basic science of thermally assisted chondroplasty. *Clin Sports Med* 2002; 21 (4): 619 - 647; DOI: 10.1016/s0278-5919(02)00020-0
- 17 Wienecke H, Lobenhoffer P. Grundlagen radiochirurgischer Systeme und ihre Anwendungen in der Arthroskopie. *Unfallchirurg* 2003; 106 (1): 2–12; DOI: 10.1007/s00113-002-0559-4
- 18 Kosy JD, Schranz PJ, Toms AD, Eyres KS, Mandalia VI. The use of radiofrequency energy for arthroscopic chondroplasty in the knee. *Arthroscopy* 2011; 27 (5): 695–703; DOI: 10.1016/j.arthro.2010.11.058
- 19 Lu Y, Edwards RB, Cole BJ, Markel MD. Thermal chondroplasty with radiofrequency energy. An in vitro comparison of bipolar and monopolar radiofrequency devices. *Am J Sports Med* 2001; 29 (1): 42–49
- 20 Kaplan LD, Uribe JW. The acute effects of radiofrequency energy in articular cartilage: an in vitro study. *Arthroscopy* 2000; 16 (1): 2–5; DOI: 10.1016/s0749-8063(00)90119-1
- 21 Yasura K, Nakagawa Y, Kobayashi M, Kuroki H, Nakamura T. Mechanical and biochemical effect of monopolar radiofrequency energy on human articular cartilage: an in vitro study. *Am J Sports Med* 2006; 34 (8): 1322–1327; DOI: 10.1177/0363546506287742
- 22 Bonutti PM, Seyler TM, Delanois RE, McMahon M, McCarthy JC, Mont MA. Osteonecrosis of the knee after laser or radiofrequency-assisted arthroscopy: Treatment with minimally invasive knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 2006; 88 Suppl 3: 69–75; DOI: 10.2106/JBJS.F.00533
- 23 Huber M, Eder C, Loibl M, Berner A, Zellner J, Kujat R, Nerlich M, Gehmert S. RFE based chondroplasty in wrist arthroscopy indicates high risk for chondrocytes especially for the bipolar application. *BMC Musculoskelet Disord* 2015; 16: 6; DOI: 10.1186/s12891-015-0460-2
- 24 Imhoff AB, Linke RD, Baumgartner R. 32.2 Klassifikation von Knorpelschäden. In: *Checkliste Orthopädie*. 2 Aufl. Stuttgart: Thieme; 2011: 570-572
- 25 Stöve J. DGOU S2k-Leitlinie Gonarthrose. Im Internet: [next.amboss.com/de/article/7H047h](http://next.amboss.com/de/article/7H047h); Stand: 23.02.2020
- 26 IRCS Klassifikation von Knorpelschäden. Im Internet: [www.traumascoreres.com/index.php/kl2-2/40-allgemein4/288-286](http://www.traumascoreres.com/index.php/kl2-2/40-allgemein4/288-286); Stand: 24.01.2018
- 27 Attal, Benedetto, Boszota, Dann, Fink, Fischmeister, Gaudernak, Genelin, Janousek, Mandl, Marlovits, Oberthaler, Pelinka, Schabus, Schneiderbauer, Schultz, Schützenberger, Smekal. Konsensuspapier des Arbeitskreises Knie und Knorpel der Österreichischen Gesellschaft für Unfallchirurgie zum Thema operative Verfahren zur Behandlung des Gelenkknorpels: Erstellung eines Behandlungsalgorithmus. Im Internet: [alt.unfallchirurgen.at/ak\\_knie/docs/Behandlung\\_des\\_Gelenkknorpels.pdf](http://alt.unfallchirurgen.at/ak_knie/docs/Behandlung_des_Gelenkknorpels.pdf); Stand: 23.02.2020
- 28 Taylor N. Nonsurgical Management of Osteoarthritis Knee Pain in the Older Adult: An Update. *Rheum Dis Clin North Am* 2018; 44 (3): 513–524; DOI: 10.1016/j.rdc.2018.03.009
- 29 Dziedzic K, Nicholls E, Hill S, Hammond A, Handy J, Thomas E, Hay E. Self-management approaches for osteoarthritis in the hand: A 2x2 factorial randomised trial. *Ann Rheum Dis* 2015; 74 (1): 108–118; DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-203938

- 30 Kloppenburg M, Kroon F. Management of hand osteoarthritis (10.04.18). Im Internet: [www.uptodate.com/contents/management-of-hand-osteoarthritis?search=osteoarthritis%20treatment&source=search\\_result&selectedTitle=5~150&usage\\_type=default&display\\_rank=5](http://www.uptodate.com/contents/management-of-hand-osteoarthritis?search=osteoarthritis%20treatment&source=search_result&selectedTitle=5~150&usage_type=default&display_rank=5); Stand: 21.03.2020
- 31 Alford JW, Cole BJ. Cartilage restoration, part 1: basic science, historical perspective, patient evaluation and treatment options. *Am J Sports Med* 2005; 33 (2): 295–306; DOI: 10.1177/0363546504273510
- 32 Slutsky DJ, Nagle DJ. Wrist arthroscopy: Current concepts. *J Hand Surg Am* 2008; 33 (7): 1228–1244; DOI: 10.1016/j.jhssa.2008.07.015
- 33 Tuan RS, Chen AF, Klatt BA. Cartilage regeneration. *J Am Acad Orthop Surg* 2013; 21 (5): 303–311; DOI: 10.5435/JAAOS-21-05-303
- 34 Angele P, Niemeyer P, Steinwachs M, Filardo G, Gomoll AH, Kon E, Zellner J, Madry H. Chondral and osteochondral operative treatment in early osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2016; 24 (6): 1743–1752; DOI: 10.1007/s00167-016-4047-8
- 35 Volz M, Zinser W, Guenther D. Matrixaugmentierte Knochenmarkstimulation. Lösung für die Schwächen der Mikrofrakturierung? *OUP* 2018; 7 (12): 588–596; DOI: 10.3238/oup.2018.0588–0596
- 36 Gay A-M, Cerlier A, Iniesta A, Legré R. Surgery for trapeziometacarpal osteoarthritis. *Hand Surg Rehabil* 2016; 35 (4): 238–249; DOI: 10.1016/j.hansur.2016.06.002
- 37 Thiede RM, Lu Y, Markel MD. A review of the treatment methods for cartilage defects. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2012; 25 (4): 263–272; DOI: 10.3415/VCOT-11-05-0070
- 38 Kim HK, Moran ME, Salter RB. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 1991; 73 (9): 1301–1315
- 39 Owens BD, Stickles BJ, Balikian P, Busconi BD. Prospective analysis of radiofrequency versus mechanical debridement of isolated patellar chondral lesions. *Arthroscopy* 2002; 18 (2): 151–155; DOI: 10.1053/jars.2002.29906
- 40 Spahn G, Hofmann GO, von Engelhardt LV. Four-year results from a randomized controlled study of knee chondroplasty with concomitant medial meniscectomy: Mechanical Debridement versus Radiofrequency Chondroplasty. *Arthroscopy* 2010; 26 (9): 73–80; DOI: 10.1016/j.arthro.2010.02.030
- 41 Lotto ML, Wright EJ, Appleby D, Zelicof SB, Lemos MJ, Lubowitz JH. Ex vivo comparison of mechanical versus thermal chondroplasty: Assessment of tissue effect at the surgical endpoint. *Arthroscopy* 2008; 24 (4): 410–415; DOI: 10.1016/j.arthro.2007.09.018
- 42 Edwards RB, Lu Y, Uthamanthil RK, Bogdanske JJ, Muir P, Athanasiou KA, Markel MD. Comparison of mechanical debridement and radiofrequency energy for chondroplasty in an in vivo equine model of partial thickness cartilage injury. *Osteoarthr Cartil* 2007; 15 (2): 169–178; DOI: 10.1016/j.joca.2006.06.021
- 43 Dillingham M. Arthroscopic electrothermal surgery of the knee. *Operative Techniques in Sports Medicine* 1998; 6 (3): 154–156; DOI: 10.1016/S1060-1872(98)80022-1

- 44 Trauner KB, Nishioka NS, Flotte T, Patel D. Acute and chronic response of articular cartilage to holmium:YAG laser irradiation. *Clin Orthop Relat Res* 1995; (310): 52–57
- 45 Yakin DE, Rogers VP. Conventional instrument vs. laser-assisted arthroscopic meniscectomy. *Lasers Surg Med* 1999; 25 (5): 435–437; DOI: 10.1002/(sici)1096-9101(1999)25:5<435::aid-lsm10>3.0.co;2-z
- 46 Turner AS, Tippet JW, Powers BE, Dewell RD, Mallinckrodt CH. Radiofrequency (electrosurgical) ablation of articular cartilage: A study in sheep. *Arthroscopy* 1998; 14 (6): 585–591; DOI: 10.1016/s0749-8063(98)70054-4
- 47 Edwards RB, Lu Y, Nho S, Cole BJ, Markel MD. Thermal chondroplasty of chondromalacic human cartilage. An ex vivo comparison of bipolar and monopolar radiofrequency devices. *Am J Sports Med* 2002; 30 (1): 90–97; DOI: 10.1177/03635465020300012801
- 48 Lu Y, Edwards RB, Nho S, Heiner JP, Cole BJ, Markel MD. Thermal chondroplasty with bipolar and monopolar radiofrequency energy: Effect of treatment time on chondrocyte death and surface contouring. *Arthroscopy* 2002; 18 (7): 779–788; DOI: 10.1053/jars.2002.32840
- 49 Lu Y, Hayashi K, Hecht P, Fanton GS, Thabit G, Cooley AJ, Edwards RB, Markel MD. The effect of monopolar radiofrequency energy on partial-thickness defects of articular cartilage. *Arthroscopy* 2000; 16 (5): 527–536; DOI: 10.1053/jars.2000.7690
- 50 Lu Y, Edwards RB, Kalscheur VL, Nho S, Cole BJ, Markel MD. Effect of bipolar radiofrequency energy on human articular cartilage. Comparison of confocal laser microscopy and light microscopy. *Arthroscopy* 2001; 17 (2): 117–123; DOI: 10.1053/jars.2001.21903
- 51 Edwards RB, Lu Y, Cole BJ, Muir P, Markel MD. Comparison of radiofrequency treatment and mechanical debridement of fibrillated cartilage in an equine model. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2008; 21 (1): 41–48; DOI: 10.3415/VCOT-07-01-0004
- 52 Huber M, Loibl M, Eder C, Kujat R, Nerlich M, Gehmert S. Effects on the Distal Radioulnar Joint of Ablation of Triangular Fibrocartilage Complex Tears With Radiofrequency Energy. *J Hand Surg Am* 2016; 41 (11): 1080–1086; DOI: 10.1016/j.jhsa.2016.08.013
- 53 Voss JR, Lu Y, Edwards RB, Bogdanske JJ, Markel MD. Effects of thermal energy on chondrocyte viability. *Am J Vet Res* 2006; 67 (10): 1708–1712; DOI: 10.2460/ajvr.67.10.1708
- 54 Edwards RB, Lu Y, Rodriguez E, Markel MD. Thermometric determination of cartilage matrix temperatures during thermal chondroplasty: Comparison of bipolar and monopolar radiofrequency devices. *Arthroscopy* 2002; 18 (4): 339–346; DOI: 10.1053/jars.2002.29893
- 55 Huber M, Schlosser D, Stenzel S, Maier J, Pattappa G, Kujat R, Striegl B, Docheva D. Quantitative Analysis of Surface Contouring with Pulsed Bipolar Radiofrequency on Thin Chondromalacic Cartilage. *Biomed Res Int* 2020; 1242086; DOI: 10.1155/2020/1242086
- 56 Bhosale AM, Richardson JB. Articular cartilage: Structure, injuries and review of management. *Br Med Bull* 2008; 87: 77–95; DOI: 10.1093/bmb/ldn025
- 57 Hunter DJ, Li J, LaValley M, Bauer DC, Nevitt M, DeGroot J, Poole R, Eyre D, Guermazi A, Gale D, Felson DT. Cartilage markers and their association with cartilage loss on magnetic resonance imaging in knee osteoarthritis: The Boston Osteoarthritis Knee Study. *Arthritis Res Ther* 2007; 9 (5); DOI: 10.1186/ar2314

- 58 Hauser K. 7 Extrazelluläre Matrix. In: Duale Reihe Biochemie. 3 Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012: 386-398
- 59 Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: Tissue design and chondrocyte-matrix interactions. Instr Course Lect 1998; 47: 477–486
- 60 Kurz B, Schünke M. Physiko-mechanische Stimulation von Zellen am Beispiel des Gelenkknorpels. In: Bruns J (Hrsg.). Tissue Engineering: Neues zum Gewebeersatz im Muskel-Skelett-System. Steinkopff; 2011: 11–13
- 61 Wachsmuth L, Söder S, Fan Z, Finger F, Aigner T. Immunolocalization of matrix proteins in different human cartilage subtypes. Histol Histopathol 2006; 21 (5): 477–485; DOI: 10.14670/HH-21.477
- 62 Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. Biomaterials 1992; 13 (2): 67–97; DOI: 10.1016/0142-9612(92)90001-5
- 63 Kääb MJ, Gwynn IA, Nötzli HP. Collagen fibre arrangement in the tibial plateau articular cartilage of man and other mammalian species. J Anat 1998; 193 (Pt 1): 23–34; DOI: 10.1017/s0021878298003744
- 64 Schmidt H-M, Lanz U. Surgical anatomy of the hand. 1 Aufl. Stuttgart: Thieme; 2004: 267
- 65 Universität Freiburg. Knorpeldicke am Knie. Im Internet: [www3.unifr.ch/apps/med/elearning/de/stuetzgewebe/gelenk/popup\\_gelenk/femur.php](http://www3.unifr.ch/apps/med/elearning/de/stuetzgewebe/gelenk/popup_gelenk/femur.php); Stand: 21.03.2020
- 66 Hall FM, Wyshak G. Thickness of articular cartilage in the normal knee. The Journal of Bone & Joint Surgery 1980; 62 (3): 408–413
- 67 Kumar P, Oka M, Toguchida J, Kobayashi M, Uchida E, Nakamura T, Tanaka K. Role of uppermost superficial surface layer of articular cartilage in the lubrication mechanism of joints. J Anat 2001; 199 (Pt 3): 241–250; DOI: 10.1046/j.1469-7580.2001.19930241.x
- 68 Buschmann MD, Grodzinsky AJ. A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage mechanics. J Biomech Eng 1995; 117 (2): 179–192; DOI: 10.1115/1.2796000
- 69 Muir H. Proteoglycans as organizers of the intercellular matrix. Biochem Soc Trans 1983; 11 (6): 613–622; DOI: 10.1042/bst0110613
- 70 Furukawa T, Eyre DR, Koide S, Glimcher MJ. Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee. J Bone Joint Surg Am 1980; 62 (1): 79–89
- 71 Polousky JD, Hedman TP, Vangsness CT. Electrosurgical methods for arthroscopic meniscectomy: A review of the literature. Arthroscopy 2000; 16 (8): 813–821; DOI: 10.1053/jars.2000.19437
- 72 Bortnick DP. Coblation: An emerging technology and new technique for soft-tissue surgery. Plast Reconstr Surg 2001; 107 (2): 614–615; DOI: 10.1097/00006534-200102000-00053
- 73 Fachinformationen der Firma DePuy Mitek, Inc., MA, USA: Depuy Mitek VAPR® System User Manual. Im Internet: [prod.mitek.depuy.edgesuite.net/IFUsforWebsite/103097.pdf](http://prod.mitek.depuy.edgesuite.net/IFUsforWebsite/103097.pdf); Stand: 21.03.2020
- 74 Forgione P. Radiofrequency Therapy. In: Fabbrocini G, Padova MPd, Tosti A (Hrsg.). Nonsurgical Lip and Eye Rejuvenation Techniques. Cham: Springer International Publishing; 2016: 45–49

- 75 Chang SD, Adler JR. Current status and optimal use of radiosurgery. *Oncology* (Williston Park, NY) 2001; 15 (2): 209-221
- 76 Reidenbach H. 2.4 Hochfrequenzchirurgie. In: *Hochfrequenz- und Lasertechnik in der Medizin: Grundlagen und Anwendungen hochfrequenter elektromagnetischer Energie für therapeutische Wärme*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1983: 112 - 113
- 77 Reidenbach H. 1.2 Elektrophysiologische Grundlagen. In: *Hochfrequenz- und Lasertechnik in der Medizin: Grundlagen und Anwendungen hochfrequenter elektromagnetischer Energie für therapeutische Wärme*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1983: 3 - 5
- 78 Reidenbach H. 2.1 Historischer Überblick und Begriffsbestimmungen. In: *Hochfrequenz- und Lasertechnik in der Medizin: Grundlagen und Anwendungen hochfrequenter elektromagnetischer Energie für therapeutische Wärme*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1983: 9 - 12
- 79 Reidenbach H. 2.3 Hochfrequenz-erwärmung. In: *Hochfrequenz- und Lasertechnik in der Medizin: Grundlagen und Anwendungen hochfrequenter elektromagnetischer Energie für therapeutische Wärme*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1983: 50 - 53
- 80 Seemen H, Schürch O. *Allgemeine und Spezielle Elektrochirurgie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1932: 18 - 19
- 81 Huschak G, Steen M, Kaisers UX. Elektrochirurgie – Grundlagen und Risiken. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2009; 1: 10–13; DOI: 10.1055/s-0028-1128179
- 82 Medvecky MJ, Ong BC, Rokito AS, Sherman OH. Thermal capsular shrinkage. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 2001; 17 (6): 624–635; DOI: 10.1053/jars.2001.24681
- 83 Haemmerich D. Biophysics of Radiofrequency Ablation. *Crit Rev Biomed Eng* 2010; 38 (1): 53–63; DOI: 10.1615/CritRevBiomedEng.v38.i1.50
- 84 Kaplan LD, Ionescu D, Ernsthausen JM, Bradley JP, Fu FH, Farkas DL. Temperature requirements for altering the morphology of osteoarthritic and nonarthritic articular cartilage: in vitro thermal alteration of articular cartilage. *Am J Sports Med* 2004; 32 (3): 688–692; DOI: 10.1177/0363546503258858
- 85 Huber M, Loibl M, Eder C, Zellner J, Kujat R, Nerlich M, Gehmert S. Temperature in and around the scapholunate ligament during radiofrequency shrinkage: a cadaver study. *J Hand Surg Am* 2015; 40 (2): 259–265; DOI: 10.1016/j.jhsa.2014.10.030
- 86 Horstman CL, McLaughlin RM. The use of radiofrequency energy during arthroscopic surgery and its effects on intraarticular tissues. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 2006; 19 (2): 65–71
- 87 Horstman CL, McLaughlin RM, Elder SH, Pool RR, Read RR, Boyle CR. Changes to articular cartilage following remote application of radiofrequency energy and with or without Cosequin therapy. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology* 2009; DOI: 10.3415/VCOT-08-02-0015
- 88 Chu CR, Kaplan LD, Fu FH, Crossett LS, Studer RK. Recovery of articular cartilage metabolism following thermal stress is facilitated by IGF-1 and JNK inhibitor. *Am J Sports Med* 2004; 32 (1): 191–196; DOI: 10.1177/0363546503260743

- 89 Huber M, Eder C, Mueller M, Kujat R, Roll C, Nerlich M, Prantl L, Gehmert S. Temperature profile of radiofrequency probe application in wrist arthroscopy: monopolar versus bipolar. *Arthroscopy* 2013; 29 (4): 645–652; DOI: 10.1016/j.arthro.2012.11.006
- 90 Kaplan LD, Chu CR, Bradley JP, Fu FH, Studer RK. Recovery of chondrocyte metabolic activity after thermal exposure. *Am J Sports Med* 2003; 31 (3): 392–398; DOI: 10.1177/03635465030310031101
- 91 Moros E. *Physics of Thermal Therapy: Fundamentals and Clinical Applications*. Hoboken: CRC Press; 2012: 24
- 92 Yetkinler DN, Greenleaf JE, Sherman OH. Histologic analysis of radiofrequency energy chondroplasty. *Clin Sports Med* 2002; 21 (4): 649 - 661; DOI: 10.1016/s0278-5919(02)00015-7
- 93 Spahn G, Hofmann GO, von Engelhardt LV. Mechanical debridement versus radiofrequency in knee chondroplasty with concomitant medial meniscectomy: 10-year results from a randomized controlled study. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2016; 24 (5): 1560–1568; DOI: 10.1007/s00167-015-3810-6
- 94 Voloshin I, Morse KR, Allred CD, Bissell SA, Maloney MD, DeHaven KE. Arthroscopic evaluation of radiofrequency chondroplasty of the knee. *Am J Sports Med* 2007; 35 (10): 1702–1707; DOI: 10.1177/0363546507304328
- 95 Gharaibeh M, Szomor A, Chen DB, MacDessi SJ. A Retrospective Study Assessing Safety and Efficacy of Bipolar Radiofrequency Ablation for Knee Chondral Lesions. *Cartilage* 2017: 1947603517703731; DOI: 10.1177/1947603517703731
- 96 Hogan CJ, Diduch DR. Progressive articular cartilage loss following radiofrequency treatment of a partial-thickness lesion. *Arthroscopy* 2001; 17 (6): E24; DOI: 10.1053/jars.2001.21254
- 97 Lu Y, Edwards RB, Nho S, Cole BJ, Markel MD. Lavage solution temperature influences depth of chondrocyte death and surface contouring during thermal chondroplasty with temperature-controlled monopolar radiofrequency energy. *Am J Sports Med* 2002; 30 (5): 667–673; DOI: 10.1177/03635465020300050601
- 98 Pell RF, Uhl RL. Complications of thermal ablation in wrist arthroscopy. *Arthroscopy* 2004; 20 (2): 84–86; DOI: 10.1016/j.arthro.2004.04.005
- 99 Kouk SN, Zoric B, Stetson WB. Complication of the use of a radiofrequency device in arthroscopic shoulder surgery: Second-degree burn of the shoulder girdle. *Arthroscopy* 2011; 27 (1): 136–141; DOI: 10.1016/j.arthro.2010.10.016
- 100 Shellock FG. Radiofrequency energy induced heating of bovine articular cartilage: comparison between temperature-controlled, monopolar and bipolar systems. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2001; 9 (6): 392–397; DOI: 10.1007/s001670100226
- 101 Amiel D, Ball ST, Tasto JP. Chondrocyte viability and metabolic activity after treatment of bovine articular cartilage with bipolar radiofrequency: An in vitro study. *Arthroscopy* 2004; 20 (5): 503–510; DOI: 10.1016/j.arthro.2004.03.018
- 102 Sotereanos DG, Darlis NA, Kokkalis ZT, Zanaros G, Altman GT, Miller MC. Effects of radiofrequency probe application on irrigation fluid temperature in the wrist joint. *J Hand Surg Am* 2009; 34 (10): 1832–1837; DOI: 10.1016/j.jhssa.2009.07.006.

- 103 McCormick F, Alpaugh K, Nwachukwu BU, Xu S, Martin SD. Effect of radiofrequency use on hip arthroscopy irrigation fluid temperature. *Arthroscopy* 2013; 29 (2): 336–342; DOI: 10.1016/j.arthro.2012.10.001
- 104 Zoric BB, Horn N, Braun S, Millett PJ. Factors influencing intra-articular fluid temperature profiles with radiofrequency ablation. *J Bone Joint Surg Am* 2009; 91 (10): 2448–2454; DOI: 10.2106/JBJS.H.01552
- 105 Gulihar A, Bryson DJ, Taylor GJS. Effect of different irrigation fluids on human articular cartilage: An in vitro study. *Arthroscopy* 2013; 29 (2): 251–256; DOI: 10.1016/j.arthro.2012.07.013
- 106 Ganguly K, McRury ID, Goodwin PM, Morgan RE, Augé li WK. Histopomorphic evaluation of radiofrequency mediated debridement chondroplasty. *Open Orthop J* 2010; 4: 211–220; DOI: 10.2174/1874325001004010211
- 107 Huang Y, Zhang Y, Ding X, Liu S, Sun T. Working conditions of bipolar radiofrequency on human articular cartilage repair following thermal injury during arthroscopy. *Chin Med J* 2014; 127 (22): 3881–3886
- 108 Ryan A, Bertone AL, Kaeding CC, Backstrom KC, Weisbrode SE. The effects of radiofrequency energy treatment on chondrocytes and matrix of fibrillated articular cartilage. *Am J Sports Med* 2003; 31 (3): 386–391; DOI: 10.1177/03635465030310031001
- 109 Li S, Chien S, Brånemark PI. Heat shock-induced necrosis and apoptosis in osteoblasts. *J Orthop Res* 1999; 17 (6): 891–899; DOI: 10.1002/jor.1100170614
- 110 Cetik O, Cift H, Comert B, Cirpar M. Risk of osteonecrosis of the femoral condyle after arthroscopic chondroplasty using radiofrequency: A prospective clinical series. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2009; 17 (1): 24–29; DOI: 10.1007/s00167-008-0604-0
- 111 Papalia R, Balzani LD, Torre G, Paciotti M, Maffulli N, Denaro V. Radiofrequency energy in the arthroscopic treatment of knee chondral lesions: A systematic review. *Br Med Bull* 2016; 117 (1): 149–156; DOI: 10.1093/bmb/ldw004
- 112 Fachinformationen der Firma Invitrogen, ThermoFisher, Dreieich, Deutschland: CellEvent™ Caspase-3/7 Green Detection Reagent. Im Internet: [www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10423](http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C10423); Stand: 01.02.2020
- 113 Tomovich S, Peng Z, Yuan C, Yan X. Quantitative Surface Characterisation Using Laser Scanning Confocal Microscopy. In: Wang CC (Hrsg.). *Laser Scanning, Theory and Applications*. InTech; 2011
- 114 Striegl B, Kujat R, Dendorfer S. Quantitative analysis of cartilage surface by confocal laser scanning microscopy. Conference: 48th DGBMT Annual Conference 2014; 59
- 115 Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 2012; 9 (7): 676–682; DOI: 10.1038/nmeth.2019
- 116 Stockwell RA. The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *J Anat* 1971; 109 (Pt 3): 411–421



- 117 Caffey S, McPherson E, Moore B, Hedman T, Vangsness CT. Effects of radiofrequency energy on human articular cartilage: An analysis of 5 systems. *Am J Sports Med* 2005; 33 (7): 1035–1039; DOI: 10.1177/0363546504271965
- 118 Meyer ML, Lu Y, Markel MD. Effects of radiofrequency energy on human chondromalacic cartilage: An assessment of insulation material properties. *IEEE Trans Biomed Eng* 2005; 52 (4): 702–710; DOI: 10.1109/TBME.2005.845155
- 119 Reidenbach H. 2.3 Elektrische Eigenschaften von biologischem Gewebe. In: *Hochfrequenz- und Lasertechnik in der Medizin: Grundlagen und Anwendungen hochfrequenter elektromagnetischer Energie für therapeutische Wärme*. Berlin, Heidelberg: Springer; 1983: 12 - 34
- 120 Barber FA, Uribe JW, Weber SC. Current applications for arthroscopic thermal surgery. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 2002; 18 (2): 40–50; DOI: 10.1053/jars.2002.31794
- 121 Rauch B, Edwards RB, Lu Y, Hao Z, Muir P, Markel MD. Comparison of techniques for determination of chondrocyte viability after thermal injury. *Am J Vet Res* 2006; 67 (8): 1280–1285; DOI: 10.2460/ajvr.67.8.1280
- 122 Kaplan LD. The analysis of articular cartilage after thermal exposure: "Is red really dead?". *Arthroscopy* 2003; 19 (3): 310–313; DOI: 10.1053/jars.2003.50087
- 123 Darlis NA, Weiser RW, Sotereanos DG. Arthroscopic triangular fibrocartilage complex debridement using radiofrequency probes. *J Hand Surg Br* 2005; 30 (6): 638–642; DOI: 10.1016/J.JHSB.2005.06.016
- 124 Arnoczky SP, Aksan A. Thermal modification of connective tissues: Basic science considerations and clinical implications. *J Am Acad Orthop Surg* 2000; 8 (5): 305–313; DOI: 10.5435/00124635-200009000-00004
- 125 Suarez-Ahedo C, Pavan Vemula S, Stake CE, Finley ZA, Martin TJ, Gui C, Domb BG. What are the current indications for use of radiofrequency devices in hip arthroscopy? A systematic review. *J Hip Preserv Surg* 2015; 2 (4): 323–331; DOI: 10.1093/jhps/hnv055

## 11. Danksagung

Ich möchte mich bei allen sehr herzlich bedanken, die mich bei meiner Arbeit für die Dissertation unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Michaela Huber für das Anvertrauen dieser Arbeit und ihre tatkräftige Unterstützung. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und nahm sich gerne Zeit für Gespräche. Ich bin ausgesprochen dankbar für die, teils auch über weite Entfernungen, gut funktionierende Kommunikation, ihre konstruktive Kritik und das Engagement, mit welchem sie mich beständig unterstützte. Die Zusammenarbeit bereitete mir unglaublich viel Freude und bereicherte mich sehr.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Frau Prof. Denitsa Docheva, die sich mit ihrem fachlichen Wissen und Ideenreichtum gerne Zeit für ein Gespräch nahm. Auch bei den hilfsbereiten Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie in Regensburg möchte ich mich bedanken.

Frau Dr. Birgit Striegl, die mich in die Arbeit am CLSM einwies, bei Fragen jederzeit Hilfestellung leistete und gemeinsam mit Frau PD Dr. Michaela Huber, Dr. Richard Kujat und Prof. Sebastian Dendorfer die Ergebnisse zu ihren Versuchen zur Verfügung stellte, soll hier ausdrücklicher Dank ausgesprochen werden. Auch Dr. Richard Kujat, der sich die Zeit nahm, mich in die Arbeitsweisen zur Vorbereitung der Proben einzuführen, soll an dieser Stelle genannt werden. Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Zeman, der mir mit seinem statistischen Wissen wertvolle Ratschläge zur Auswertung der Ergebnisse gab.

Maximilian Voigt und Susanne Stenzel danke ich für die Bereitstellung ihrer Vorversuche.

Größter Dank gilt meiner Familie und meinem Freund, die mich während der Arbeit für die Dissertation und während des gesamten Studiums tatkräftig unterstützten. Ein großes Dankeschön an euch für euren beständigen Rückhalt und die bedingungslose Unterstützung.